



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

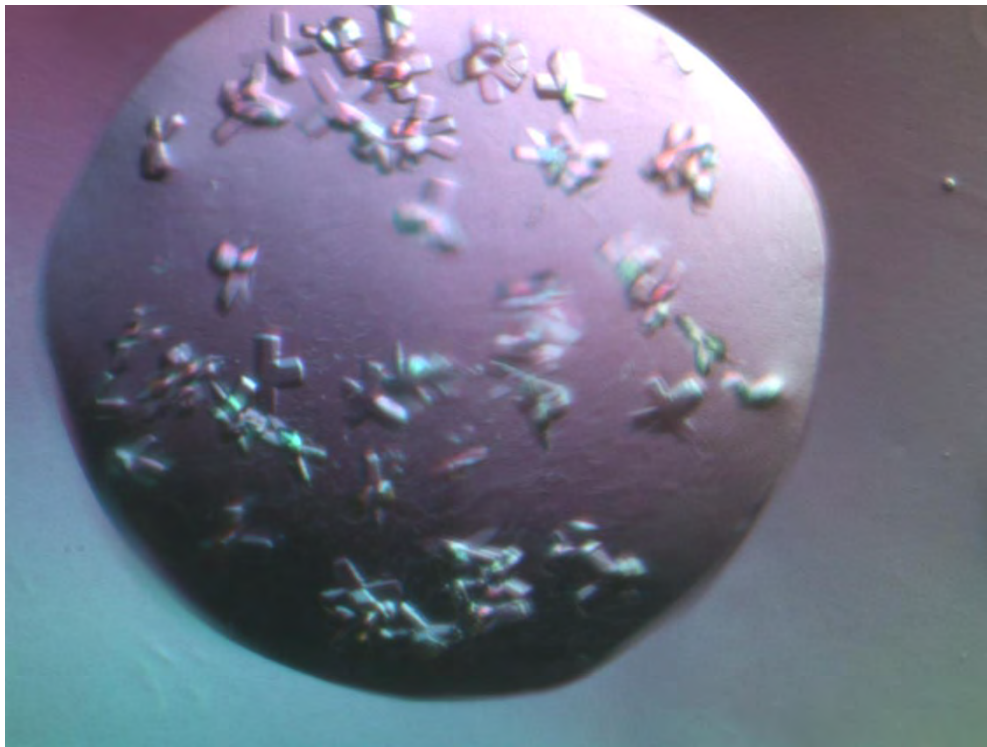
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΑΘΗΜΕΝΗΣ ΣΤΑΓΟΝΑΣ

ΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ»



ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΑΔΑΜΟΥ-ΑΝΔΡΟΥΛΑΚΗ

Λάρισα 2017

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΑΘΗΜΕΝΗΣ ΣΤΑΓΟΝΑΣ

ΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ»

«SCREENING OF CRYSTALLIZATION CONDITIONS OF

GLYCOGEN PHOSPHORYLASE USING THE SITTING DROP METHOD

FOR HIGH THROUGHPUT AUTOMATED CRYSTALLISATION SYSTEMS»

Τριμελής Επιτροπή

- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική (Επιβλέπουσα)**
Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- **Δρ. Λεωνίδας Δημήτριος**
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

- **Δρ. Κοντού Μαρία**
Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

I.Περίληψη.....	5
II.Abstract.....	6
III.Ευχαριστίες.....	7
1.Εισαγωγή.....	8
1.1.Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-X.....	8
1.2.Θεωρία κρυστάλλωσης.....	9
1.3.Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.....	11
1.4.Μέθοδοι κρυστάλλωσης	15
1.4.1.Διάχυση ατμών.....	15
1.4.2.Μέθοδος διαπίδυσης.....	16
1.4.3.Μικροσπορά/μακροσπορά.....	16
1.4.4.Μέθοδος batch.....	18
1.5.Χαρακτηρισμός αποτελεσμάτων κρυστάλλωσης και ανάλυση.....	19
1.6.Πηγές ακτίνων-X και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	22
1.7.Σύστημα Robot και κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης.....	26
1.8.Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	27
1.8.1.Γενική περιγραφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	28
1.8.2.Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος ανάπτυξης φαρμάκων κατευθυνόμενων από τη δομή.....	29
2.Σκοπός.....	30
3.Πειραματικό μέρος.....	31
3.1.Υλικά-Όργανα.....	31
3.2.Μέθοδοι.....	32
3.2.1.Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας <i>Oryctolagus cuniculus</i>	32
3.2.2.Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για κρυστάλλωση.....	36
3.2.3.Παραγωγή πυρήνων κρυστάλλωσης.....	37
3.2.4.Κρυστάλλωση gmGPb με τη στατική μέθοδο Batch.....	38

3.2.5.Κρυστάλλωση rmGPb με την τεχνική Microbatch.....	38
3.2.6.Διερεύνηση συνθηκών κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας.....	39
3.2.7.Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	41
4.Αποτελέσματα.....	42
4.1.Τριβλία κρυστάλλωσης 24 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας.....	42
4.2.Τριβλία κρυστάλλωσης 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας για Robot OryxNano.....	43
4.3.Τριβλία κρυστάλλωσης 96 θέσεων τύπου microbatch με χρήση ελαίου παραφίνης.....	52
5.Βιβλιογραφία.....	56
V.Παράρτημα.....	58

Ι.Περίληψη

Το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου(GP) καταλύει το πρώτο στάδιο αποικοδόμησης του γλυκονόνου και έχει αναγνωριστεί ως μοριακός στόχος για την ανάπτυξη φαρμάκων που αφορούν διάφορες μεταβολικές ασθένειες, το σακχαρώδη διαβήτη αλλά και τον καρκίνο. Τα προηγούμενα χρόνια έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών σε υψηλή ευκρίνεια η τρισδιάστατη δομή της και έχουν αναγνωριστεί διάφορα κέντρα σύνδεσης μικρών μορίων που δρουν ως αναστολείς του ενζύμου. Η αναγνώριση των παραπάνω κέντρων σύνδεσης οδήγησε σε μια συστηματική μελέτη αναγνώρισης βιοδραστικών μορίων που δρουν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η μελέτη αυτή διευκολύνεται από την ανάπτυξη νέων αυτοματοποιημένων συστημάτων κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης του ενζύμου με τη στατική μέθοδο batch επέτρεψε την μελέτη των συμπλόκων προσδετών-ενζύμου σε υψηλή ευκρίνεια. Εντούτοις, η τεχνική αυτή δεν είναι απόλυτα συμβατή με τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα συστήματα κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων σε ειδικούς γυάλινους σωλήνες απαιτεί υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης και η συλλογή δεδομένων πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος που απαιτεί τη χρήση ειδικών τριχοειδών σωλήνων(capillaries). Απαιτείται λεπτός και χρονοβόρος χειρισμός καθιστώντας δύσχρηστη τη μαζική μελέτη κρυστάλλων συμπλόκου ενζύμου-προσδέτη σε συστήματα υψηλής απόδοσης. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση νέων συνθηκών που θα επιτρέψει την κρυστάλλωση του ενζύμου σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας (διάχυση ατμών) και σε format πλήρως συμβατό με τα συστήματα κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης.

II. Abstract

The enzyme glycogen phosphorylase (GP) catalyzes the first stage of glycogen degradation and has been recognized as a molecular target for the development of drugs against various metabolic diseases, diabetes mellitus and cancer. In previous years, its three-dimensional structure has been determined at high resolution by the method of X-ray protein crystallography and several small molecule binding sites have been identified acting as inhibitors of the enzyme. Identification of the above binding sites resulted in a systemic recognition study of bioactive molecules that act as inhibitors of glycogen phosphorylase. This study is facilitated by the development of new automated protein crystallization systems. Determination of the optimal crystallization conditions of the enzyme using the batch crystallization method allowed the ligand-enzyme complexes to be studied in high resolution. However, this technique is not fully compatible with modern high performance automated crystallization systems. The growth of crystals in special glass tubes requires high protein concentration and data collection should be at ambient temperature requiring the use of specific capillaries. Laborious and time-consuming manipulation is required, making the massive study of enzyme-ligand complex crystals difficult for use by high-throughput systems. The objective of this project is to investigate new conditions that will allow crystallization of the enzyme at lower concentrations using the "sitting drop" method (vapor diffusion) and in a format fully compatible with high performance crystallization systems.

III. Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Οκτώβριο του 2016 έως τον Ιούλιο του 2017.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορα Βιοχημείας-Μεταβολισμού, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κάτω από την επίβλεψη της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την ανάθεση της εργασίας και τη δυνατότητα εξοικίωσης μου με την συνθήκες του εργαστηριακού περιβάλλοντος ενός ερευνητικού εργαστηρίου. Οι γνώσεις, η εμπείρια και η καθοδήγη της κατείχαν καταλυτικό ρόλο στην διεύρυνση τρόπο σκεψης μου. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την αμέριστη κατανόηση που έδειξε σε προσωπικό επίπεδο. Τις ευχαριστίες μου παραθέτω και στα μέλη της τριμελούς επιτροπή μου τον κύριο Δημήτριο Λεωνίδα, καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και την κυρία Κοντού Μαρία, επίκουρο καθηγήτρια πρωτεϊνικής χημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω από καρδιάς τους υποψήφιους διδάκτορες, τους κυρίους Γιώργο Στραβοδήμο και Ευθύμιο Κυριάκη για την πολύτιμη βοήθεια καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου, ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν όποια απορία προέκυπτε. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς φοιτητές Άλκηστις Γκέρδη, Αγγελική Εξάρχου, Συμεών Κούλα, Θωμά Μπάρκα, Ευγενία Σταμάτη και Αναστασία Τσαγκαράκου για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα όλο αυτό το χρονικό διάστημα, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που συνέβαλλε στην ομαλή ένταξη μου στο εργαστήριο και το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου τον κύριο Ζωγράφο Σπύρο, Ερευνητή Β στο εργαστήριο Δομικής Βιολογία και Χημεία του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών καθώς και την υποψήφια διδάκτορ κυρία Μπέττυ Λίγγρη για τη φιλοξενία τους στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και την πολύτιμη συνεισφορά τους στη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

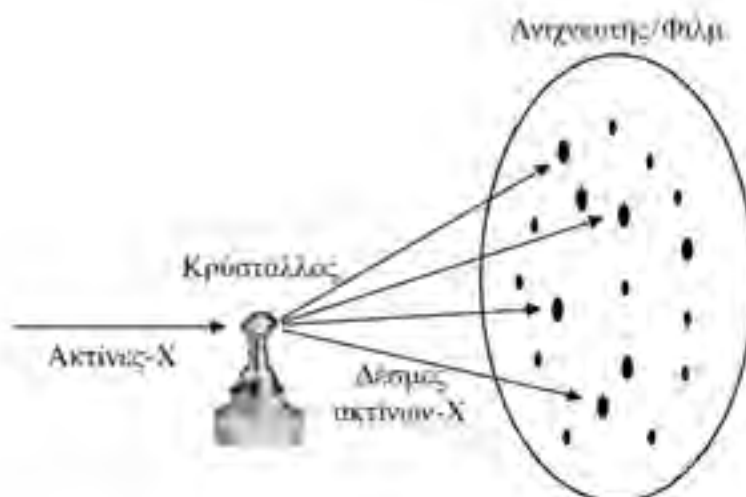
Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και το φιλικό μου περιβάλλον για την κατανόηση, στήριξη και ενθάρυνση για την περάτωση της διπλωματικής αλλά και για τη συνολική συμβολή τους σε υλικό και ψυχικό επίπεδο όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου

1. Εισαγωγή

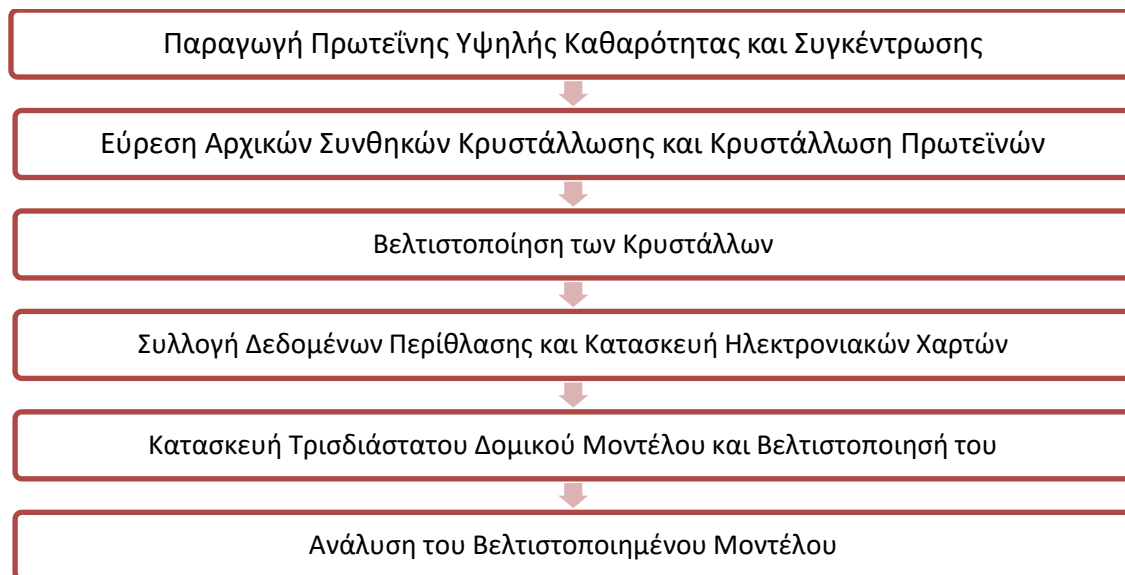
1.1 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ είναι μια από τις τρεις βασικότερες μεθόδους προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των βιολογικών μακρομορίων και είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική.[1] Οι άλλες δύο τεχνικές είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Με την κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ έχει προσδιοριστεί πάνω από το 80% των πρωτεϊκών δομών που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών(PDB). Βασική προϋπόθεση για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ είναι η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων που να περιθλούν ισχυρά τις ακτίνες-Χ. (Εικόνα 1) Η μέθοδος συλλογής δεδομένων από πρωτεϊκούς κρύσταλλους βασίζεται στην πρόσπτωση δέσμης ακτίνων-Χ πάνω σε έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο παράγοντας ένα φάσμα το λεγόμενο διάγραμμα περίθλασης (diffraction pattern). Μέσω της ανάλυσης του οποίου μπορεί να προσδιοριστεί η δομή της υπό εξέταση πρωτεΐνης.[3]

Ο προσδιορισμός της δομής των πρωτεϊνών μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ αποτελείται από έξι στάδια. Τα στάδια αυτά απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 1** που ακολουθεί.[4]



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση πειράματος κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ [2]



Διάγραμμα 1: Στάδια επίλυσης της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών [4]

Η τεχνολογική πρόοδος που έχει σημειωθεί στη μόντερνα κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών (αυτοματοποιημένα συστήματα υψηλής απόδοσης, συγχροτρονική ακτινοβολία, κρυογονικές συνθήκες) έκανε τη διαδικασία περισσότερο αποτελεσματική. Παρόλα αυτά η δυσκολία στην εύρεση συνθηκών κρυστάλλωσης αποτελεί το μείζον πρόβλημα στην επίλυση της δομής των πρωτεϊνών. [4]

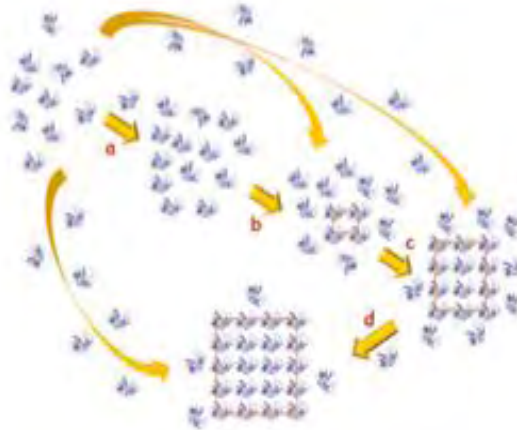
1.2 Θεωρία Κρυστάλλωσης

Ως κρύσταλλος ορίζεται μια φάση της στερεής κατάστασης όπου έχουμε επαναλαμβανόμενη διευθέτηση ατόμων ή μορίων σε τρεις διαστάσεις.[4] Οι κρύσταλλοι χαρακτηρίζονται από συμμετρία και περιοδικότητα, κάθε κρύσταλλος δημιουργείται από πολλά δισεκατομμύρια μικρές πανομοιότυπες επαναλαμβανόμενες μονάδες η κάθε μια από τις οποίες ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Οι στοιχειώδεις κυψελίδες πακετάρονται η μια δίπλα στην άλλη στις τρεις διαστάσεις και μπορούν να περιέχουν ένα ή περισσότερα του ενός μόρια.

Επτά διαφορετικά είδη στοιχειωδών κυψελίδων αποτελούν τα επτά κρυσταλλικά συστήματα, τα οποία είναι η βάση για την ταξινόμηση των κρυστάλλων: 1) κυβικό, 2) τετραγωνικό, 3) ορθορομβικό, 4) μονοκλινές, 5) τρικλινές, 6) ρομβοεδρικό (και τριγωνικό), και 7) εξαγωνικό. Συνδυάζοντας όλα τα στοιχεία συμμετρίας του τρισδιάστατου χώρου προκύπτουν συνολικά 230 διαφορετικοί συνδυασμοί που ονομάζονται ομάδες χώρου (space groups).

Η κρυστάλλωση των βιομορίων διακρίνεται σε τρία στάδια. Αρχικά στο στάδιο της πυρήνωσης αναπτύσσονται οι κρίσιμοι πυρήνες. Οι κρίσιμοι πυρήνες αποτελούν σταθερά συσσωματώματα που σχηματίζονται από τη συσχέτιση μιας μικρής ποσότητας μορίων του διαλύματος κρυστάλλωσης σε

τρεις διαστάσεις. Το δεύτερο στάδιο είναι η ανάπτυξη των κρυστάλλων. Μόρια προσελκύονται από τους ήδη σχηματισμένους κρίσιμους πυρήνες και προσκολλώνται στην επιφάνειά τους ταξινομημένα για το σχηματισμό των κρυστάλλων. Το τρίτο στάδιο της κρυστάλλωσης είναι η διακοπή της ανάπτυξης. Όταν στο κορεσμένο διάλυμα εξαντληθούν τα μόρια της πρωτεΐνης η ανάπτυξη του κρυστάλλου τερματίζεται. Επομένως στη σταγόνα υπάρχει η τελική μορφή του. (Εικόνα2) [4]



Εικόνα 2: Στάδια ανάπτυξης κρυστάλλων(1) (α) Σχηματισμός σταθερών αλληλεπιδράσεων, (b) Ανάπτυξη κρίσιμου πυρήνα, (c) Ανάπτυξη κρυστάλλου, (d) Αύξηση του μεγέθους του κρυστάλλου. [4]

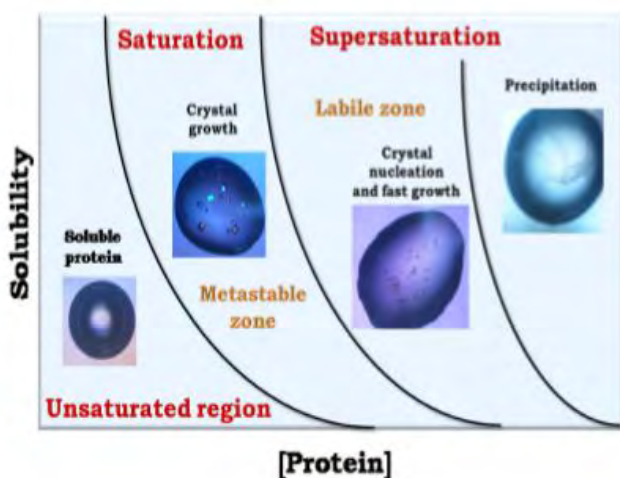
Το διάγραμμα φάσης

Για τη δημιουργία πρωτεϊνικού κρυστάλλου η πρωτεΐνη πρέπει να βρίσκεται ή να μεταφερθεί σε ένα υπερκορεσμένο διάλυμα, ώστε να παραχθεί η θερμοδυναμική κινητήρια δύναμη για την κρυστάλλωση. Σε ένα κεκορεσμένο διάλυμα, υπάρχουν δύο καταστάσεις σε ισορροπία: η στερεή φάση και μία αποτελούμενη από μόρια ελεύθερα σε διάλυμα. [5]

Τα στάδια της κρυστάλλωσης μπορούν να συνοψιστούν σε ένα διάγραμμα, το λεγόμενο διάγραμμα φάσης το οποίο φαίνεται στο **Διάγραμμα 2**. Το διάγραμμα φάσης επιδεικνύει συναρτήσει δύο μεταβλητών (διαλυτότητα και συγκέντρωση της πρωτεΐνης) τις σταθερές καταστάσεις του διαλύματος (υγρό, κρύσταλλος, ίζημα). Το διάλυμα της πρωτεΐνης είναι υπερκορεσμένο όταν η συγκέντρωση του μεταβαίνει το όριο διαλυτότητας. Σύμφωνα με το βαθμό υπερκορεσμού το διάγραμμα φάσης διαιρείται σε τρεις περιοχές: τη ζώνη υπερκορεσμού, όπου σχηματίζονται συσσωματώματα των μορίων της πρωτεΐνης, τη ζώνη ενδιάμεσου κορεσμού και τη ζώνη χαμηλού υπερκορεσμού στην οποία ευνοείται η ανάπτυξη κρυστάλλου. Τα όρια μεταξύ των τριών περιοχών δεν είναι καλά καθορισμένα. Εάν σε ένα τέτοιο διάλυμα ο διαλύτης αποσύρεται σταδιακά

με εξάτμιση ή παρατηρηθούν αλλαγές σε κάποιον από τους παράγοντες κρυστάλλωσης τότε το διάλυμα μεταβαίνει σε μια κατάσταση υπερκορεσμού. Η ισορροπία μπορεί να επιτευχθεί ξανά με την επαναφορά της στερεής φάσης. Εάν δεν υπάρχει η στερεή φάση μετά τη μεταβολή των συνθηκών η διαλυμένη ουσία δεν θα χωριστεί αμέσως σε δύο φάσεις και το διάλυμα θα παραμείνει στην υπερκορεσμένη κατάσταση. [4]

Βασιζόμενοι στο διάγραμμα φάσης θα λέγαμε ότι για την ανάπτυξη ιδανικών κρυστάλλων για περίθλαση ακτίνων Χ, η πυρήνωση πρέπει να ξεκινήσει από την περιοχή υψηλού υπερκορεσμού οριακά πάνω από τη μετασταθερή περιοχή. Εκεί, η ανάπτυξη θα συμβεί αργά, καθώς λόγω της δημιουργίας πυρήνων το διάλυμα μειώνεται βαθμιαία, οδηγώντας το σύστημα στην μετασταθερή περιοχή. Εκεί δεν μπορούν να σχηματιστούν επιπλέον κρίσιμοι πυρήνες, και οι ήδη υπάρχοντες θα αναπτυχθούν με σταθερό ρυθμό. [4,5]



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα φάσης [4]

Ωστόσο, η διαδικασία της κρυστάλλωσης είναι επίπονη καθώς για την εύρεση των ιδανικών συνθηκών απαιτούνται πολλές δοκιμές και αλλαγές των επιμέρους παραμέτρων. Η αλλαγή μίας παραμέτρου από τις πολλές που επηρεάζουν την κρυστάλλωση μπορεί να μεταβάλει ολόκληρο το σύστημα της κρυστάλλωσης. Επομένως η απόκτηση καλοσχηματισμένων κρυστάλλων που περιθλούν ισχυρά τις ακτίνες-Χ προϋποθέτει την διερεύνηση και δοκιμή ενός μεγάλου εύρους συνθηκών. [4]

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Η ανάπτυξη κρυστάλλων μακρομορίων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει πολλές παράμετρους καθώς εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν τροχοπέδη στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών ελέγχοντας τον υπερκορεσμό του συστήματος και, συνεπώς, έμμεσα, τον ρυθμό πυρήνωσης και ανάπτυξης. Οι παράγοντες αναφέρονται στον **Πίνακα 1** [5]. Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες κρυστάλλωσης χρησιμοποιείται η μέθοδος δοκιμής σφάλματος (trial-error method). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στις ήδη γνωστές συνθήκες με αλλαγές σε διαφορετικές παραμέτρους κάθε φορά. [4]

Φυσικοί Παράγοντες	Χημικοί Παράγοντες	Βιοχημικοί Παράγοντες
Θερμοκρασία	Κατακρημνιστικός παράγοντας	Καθαρότητα του δείγματος
Πίεση	pH	Ομοιογένεια δείγματος
Βαρύτητα	Ρυθμιστικό διάλυμα	Τροποποιήσεις ακολουθιών
Μαγνητικό πεδίο	Ιοντική ισχύ	Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις
Ηλεκτρικό πεδίο	Συγκέντρωση δείγματος	Χημικές τροποποιήσεις
Διηλεκτρικές ιδιότητες	Μεταλλικά ιόντα	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Ιξώδες	Απορρυπαντικά	Πρωτεύουσα
Δονήσεις και ήχος	Βαρέα μέταλλα	Ισοηλεκτρικό σημείο
Χρόνος	Προσμίξεις	Προσδέτες, συμπράγοντες, αναστολείς
Ποσοστό εξισορρόπησης	Πηγή αντιδραστηρίου	Ιδιότητες πρωτεϊνών (υδροφοβικότητα, οξειδωση, υδροφιλικότητα)
Πυρήνες	Σύνθεση αντιδραστηρίου	Συμμετρία
Μεθοδολογία	Βαθμός υπερκορεσμού	Σταθερότητα
Δειγματοληψία	Επιφανειοδραστικές ουσίες/αμφολύτες	

Πίνακας 1: Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Από τις κυριότερες παραμέτρους είναι οι παρακάτω

✓ Θερμοκρασία

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία. Η συνάρτηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης με τη θερμοκρασία δεν είναι μια ιδιότητα της ίδιας της πρωτεΐνης, αλλά συνδέεται πολύ με το σύστημα πρωτεϊνών-διαλύματος. Σε περιπτώσεις όπου έχουμε πρωτεΐνες με κανονική διαλυτότητα, αυτή αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας σε χαμηλή ιοντική ισχύ, όταν παραδείγματος χάρη το διάλυμα περιέχει συστατικά με χαμηλή διηλεκτρική σταθερά, αντίθετα σε υψηλή ιοντική ισχύ η διαλυτότητα εμφανίζει πτώση. Εξίσου σημαντική είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς πυρήνωσης και ανάπτυξης πρωτεϊνικών κρυστάλλων και στη θέση ισορροπίας της δοκιμής. Σε εργαστηριακό επίπεδο οι συνήθεις θερμοκρασίες διεξαγωγής πειραμάτων είναι 4°C, 16 °C, 20°C ενώ έχουν αναπτυχθεί συσκευές κρυστάλλωσης που ελέγχουν πολύ εξειδικευμένα τη θερμοκρασία με σκοπό την εκμετάλλευση αυτής της παραμέτρου όσον αφορά το μηχανισμό ανάπτυξης κρυστάλλων και τη μορφολογία τους. [4]

✓ Ιοντική ισχύς

Η ιοντική ισχύς είναι ένας ακόμα βασικός παράγοντας της κρυστάλλωσης. Σε ένα διάλυμα με χαμηλή ιοντική ισχύ, τα κατιόντα που είναι διαθέσιμα δεν επαρκούν για τη διατήρηση της διαλυτότητας των μορίων, οδηγώντας στην ανάπτυξη κρυστάλλων. Επίσης, η ιοντική ισχύς αποτελεί το μέτρο της αποτελεσματικότητας της επίδρασης των αλάτων στην ανάπτυξη κρυστάλλων. Οι σημαντικότεροι καταβυθιστικοί παράγοντες είναι τα πολυσθενή ιόντα. Για την επίτευξη της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών η ιοντική ισχύς του διαλύματος πρέπει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα.[5]

✓ pH

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μπορεί να αλλάξει δραματικά καθώς στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) το φορτίο είναι μηδενικό και δεν είναι διαλυτές. Επιπροσθέτως το pH επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη των κρυστάλλων ή την αναστολή αυτής. Στο pI το φορτίο της πρωτεΐνης ισούται με το μηδέν καθώς τα θετικά φορτία αντισταθμίζονται από τα αρνητικά. Έτσι όταν το pH εξισωθεί με το pI της πρωτεΐνης σταματά να επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Αυτή είναι η ιδανική κατάσταση της πρωτεΐνης για την ανάπτυξη κρυστάλλων. Πειραματικά κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό μέχρι πρότινος, για αυτό το λόγο σε δοκιμές κρυστάλλωσης δοκιμάζεται ένα ευρύ φάσμα pH. Ωστόσο μόνο τιμές pH που διατηρούν την πρωτεΐνη σε αναδιπλωμένη μορφή είναι αποδεκτές.[4]

✓ Συγκέντρωση πρωτεΐνης

Οι πρωτεΐνες κρυσταλλώνονται σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Έρευνες έδειξαν ότι η πιθανότητα ανάπτυξης κρυστάλλων ενισχύεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση είναι ένας από τους παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν το σύστημα σε κατάσταση υπερκορεσμού άλλα και στο σχηματισμό σταθερών πυρήνων στην ασταθή περιοχή. Αυτό ωστόσο δεν συνεπάγεται απαραίτητα την ανάπτυξη άψογων κρυστάλλων. Συνήθως για πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιείται συγκέντρωση πρωτεΐνης 10-20 mg/mL.[4]

✓ Πρόσθετα

Οποιαδήποτε ουσία διαφορετική από το πρωτεϊνικό διάλυμα, το ρυθμιστικό διάλυμα και το παράγοντα καταμνήμισης θεωρείται πρόσθετο. Η κυριότερη κατηγορία πρόσθετων είναι τα ανόργανα άλατα. Η χρήση πρόσθετων στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των κρυστάλλων και την πυρήνωση.

Υπάρχουν συνολικά επτά κατηγορίες μορίων συμφωνα με τον McPherson[6] που θεωρούνται πρόσθετα. Η πρώτη είναι τα φυσικά

πρόσθετα τα οποία προσδένονται στην πρωτεΐνη όπως τα συνένζυμα και οι αναστολείς. Η δεύτερη είναι χημικά μόρια που διατηρούν την ακεραιότητα της πρωτεΐνης όπως τα μέταλλα. Τρίτη κατηγορία είναι τα δηλητήρια, δρουν αναστέλλοντας την πυρήνωση ή/και την ανάπτυξη των κρυστάλλων υψηλής ποιότητας(DMSO), όταν προστεθούν σε μεγάλη συγκέντρωση. Η τέταρτη είναι οι ομοιοπολικοί διασυνδέτες, οι οποίοι μειώνουν τη σταθερότητα πρωτεΐνης-προσδέτη καθώς και την διαμορφωτική κινητικότητα της πρωτεΐνης. Η πέμπτη είναι τα απορρυπαντικά. Ως απορρυπαντικά δρουν χαμηλές συγκεντρώσεις χαστροπικών και τασιενεργών παραγόντων. Η έκτη κατηγορία αποτελείται από τους οσμολύτες που βοηθούν στην αποδοχή του ωσμωτικού στρες ώστε να παραμείνει η πρωτεΐνη στη φυσική της διαμόρφωση(TMAO). Η τελευταία κατηγορία είμαι οι μη ομοιοπολικοί διασυνδέτες οι οποίοι είναι ικανοί να σταθεροποιήσουν το κρυσταλλικό πλέγμα μέσω αναστρέψιμων ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.[4]

✓ Καταβυθιστικοί παράγοντες

Οι καταβυθιστικοί παράγοντες είναι χημικές ενώσεις που μειώνουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ενισχύουν την έλξη μεταξύ των μορίων και δρουν με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι μεταβάλλοντας το συντελεστή δραστηριότητας του νερού(άλατα) και ο δεύτερος είναι η μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου διαλυτοποίησης κάτι που επιτυγχάνουν οι οργανικοί διαλύτες. Οι οργανικοί διαλύτες επηρεάζουν τις μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις κι τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- διαλύτη. Υπάρχει ένα εκτεταμένο φάσμα μορίων που δρουν ως καταβυθιστικοί παράγοντες. Οι κυριότεροι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην κρυσταλλογραφία είναι το DMSO και MPD, τα κυριότερα πολυμερή είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη διαφόρων συγκεντρώσεων. [4]

✓ Υπαρξη υποστρώματος, συνενζύμου, αναστολέα

Η συμπλοκοποίηση μιας υπό κρυστάλλωση πρωτεΐνης με ένα φυσικό προσδέτη πριν την διαδικασία της κρυστάλλωσης μπορεί να οδηγήσει στη σταθεροποίηση και στην επίτευξη μεγαλύτερου βαθμού ομοιογένειας των πρωτεϊνικών μορίων (συγκρυστάλλωση). [5]

Σήμερα στη σάρωση συνθηκών με σκοπό τον εντοπισμό νέων συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιούνται εμπορικά kit που βασίζονται στην μέθοδο της μη εξαντλητικής σάρωσης(<<Sparse Matrix>>). Τα εν λόγω kit χρησιμοποιούνται στα αρχικά στάδια των προσπαθειών κρυστάλλωσης. Περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό συνθηκών pH, ρυθμιστικού διαλύματος, αλάτων και του καταβυθιστικού παράγοντα. Ο συνδυασμός προσδιορίζεται στατιστικά από συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν προγενέστερα με επιτυχία. [7]

1.4 Μέθοδοι Κρυστάλλωσης

Για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές που οδηγούν ένα πρωτεϊνικό διάλυμα σε μια υπερκορεσμένη κατάσταση. Αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι οι ακόλουθες:

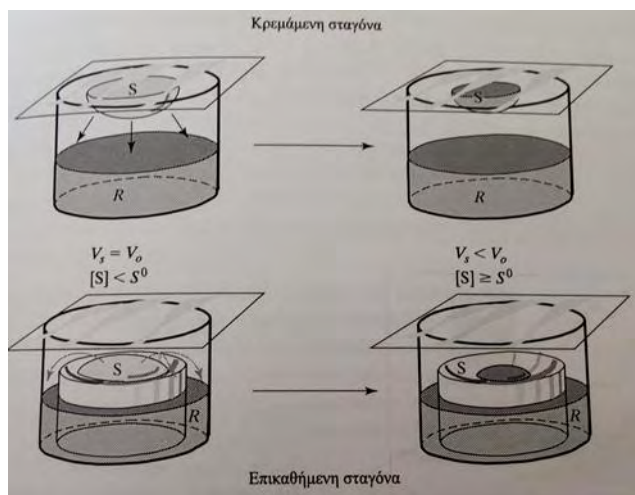
- διάχυση ατμών (vapor diffusion), που περιλαμβάνει τις τεχνικές της κρεμάμενης και καθήμενης σταγόνας (hanging and sitting drop),
- μικροσπορά/μακροσπορά (microseeding/macroseeding)
- μέθοδος διαπίδυσης (dialysis)
- στατική μέθοδος batch

Οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη διαλυτότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος και τον τρόπο με τον οποίο εκτίθεται το διάλυμα αυτό στο διάλυμα κρυστάλλωσης/ εξισορρόπησης.

1.4.1 Διάχυση ατμών

Στη μέθοδο διάχυσης ατμών μια σταγόνα πρωτεϊνικού διαλύματος φέρεται σταδιακά σε κατάσταση υπερκορεσμού μέσω της διάχυσης ατμών από τη σταγόνα προς μια μεγαλύτερη δεξαμενή που περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα αλλά υψηλότερες συγκεντρώσεις καταβυθιστικού παράγοντα σε σχέση με τη σταγόνα (διάλυμα εξισορρόπησης). Δύο είναι οι τεχνικές που στηρίζονται στη διάχυση ατμών και εφαρμόζονται ευρέως αυτές της κρεμάμενης και καθήμενης σταγόνας. Στη τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας μια μικρή σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος εξισορρόπησης τοποθετείται συνήθως σε ανολογία 1:1 (1-3μl) σε μια μικρή γυάλινη καλυπτρίδα που σφραγίζεται αεροστεγώς ανάποδα ώστε η σταγόνα να κρέμεται πάνω από μια μικρή δεξαμενή/πηγάδι σε ειδικό τριβλίο κρυστάλλωσης που περιέχει σχετικά μεγάλο όγκο (700-1000 μl) διαλύματος εξισορρόπησης. Η συγκέντρωση του κατακρυμνιστή στη σταγόνα αυξάνεται λόγω της μεταφοράς νερού από τη σταγόνα στον κατακρυμνιστή (διάχυση ατμών) μέχρι να επιτευχθεί ο κορεσμός. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει ήπιες και βαθμιαίες αλλαγές της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστικού παράγοντα, οι οποίες βοηθούν στο σχηματισμό μεγάλων και καλά οργανωμένων κρυστάλλων. **(Εικόνα 3)** [4]

Η τεχνική της καθήμενης σταγόνας διαφοροποιείται μόνο από το γεγονός ότι στην τελευταία η σταγόνα τοποθετείται (κάθεται) σε ένα βοθρίο το οποίο διαχωρίζεται από τη δεξαμενή **(Εικόνα 2)** Η προετοιμασία της μεθόδου της καθήμενης σταγόνας είναι απλή είτε πρόκειται για δοκιμή με το χέρι είτε για δοκιμή με τη χρήση ρομπότ επιτρεποντας τη διαλογή ενός μεγάλου αριθμού συνθηκών κρυστάλλωσης. [4]



Εικόνα 3: Μέθοδος διάχυσης ατμών, επάνω φαίνεται η κρεμάμενη σταγόνα ενώ κάτω η καθήμενη [7]

1.4.2 Μέθοδος Διαπίδυσης

Σε αυτή τη μέθοδο το πρωτεϊνικό διάλυμα διαχωρίζεται από το διάλυμα εξισορρόπησης διαμέσου ημιπερατής μεμβράνης. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στην οποία επιτυγχάνεται η κρυστάλλωση προσεγγίζεται αργά μέσω διάχυσης και εξισορρόπησης των μορίων του καταβυθιστικού παράγοντα διαμέσου της ημιπερατής μεμβράνης. Με την προϋπόθεση ότι τα μόρια του καταβυθιστικού είναι μικρά μπορούν εύκολα να εισχωρήσουν διαμέσου της μεμβράνης διαπίδυσης και να εξισορροπήσουν αργά την πρωτεΐνη με το καταβυθιστικό διάλυμα. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης έως ότου η σωστή συνθήκη κρυστάλλωσης επιτευχθεί. Η ταχύτητα εξισορρόπησης μπορεί να τροποποιηθεί μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν σακουλάκια διαπίδυσης όταν διατίθενται μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης ή σωλήνες μικροδιαπίδυσης (button) η μέθοδος αυτή δεν είναι συμβατή με χρήση διαλυμάτων PEG ως καταβυθιστικών παραγόντων.[4]

1.4.3 Μικροσπορά/ μακροσπορά (microseeding/macroseeding)

Η πυρήνωση είναι ο σχηματισμός των πρώτων ταξινομημένων συσσωματωμάτων των μορίων της πρωτεΐνης. Το συσσωματώματα που δημιουργούνται αποτελούν ένα πρότυπο ανάπτυξης για τον κρύσταλλο καθώς πάνω σε αυτά προσκολλώνται επιπλέον μόρια της πρωτεΐνης.[8] Για το λόγο αυτό πολλές φορές είναι επιθυμητή η προγενέστερη ανάπτυξη κρυστάλλων που έχουν προκύψει από ένα σε μεγάλο βαθμό υπέρκορο διάλυμα με αποτέλεσμα τον κακόμορφο σχηματισμό κρυστάλλων. Για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων αλλά και για την προσφορά στην υπό μελέτη πρωτεΐνη ενός προτύπου ανάπτυξης για το σχηματισμό κρυστάλλων επάγεται ανάπτυξη κατά κατευθυνόμενο

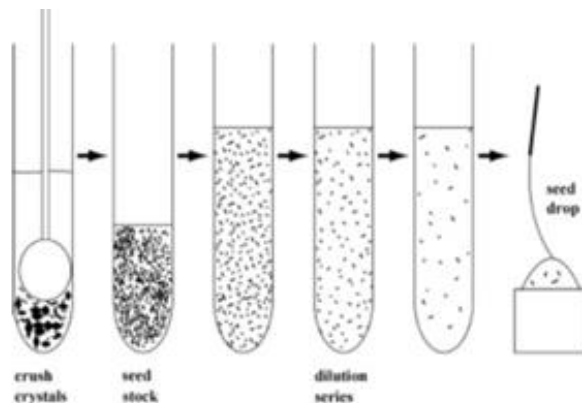
τρόπο σε χαμηλά επίπεδα υπερκορεσμού. Αυτό επιτυγχάνεται με την τεχνική της σποράς(seeding) [5]. Η τεχνική της σποράς υποδιαιρείται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος των πυρήνων[9]:

- μικροσπορά(microseeding), μεταφορά στο διάλυμα μικροσκοπικών κρυστάλλων που λόγω του μικρού τους μεγέθους δεν είναι διακριτοί μεμονωμένα
- μακροσπορά(macroseeding), η μεταφορά ενός μόνο κρυστάλλου, συνήθως 5-50 μm.

Και στις δύο τεχνικές σποράς το διάλυμα στο οποίο προστίθενται πρέπει να είναι ελαφρώς υπερκορεσμένο(μετασταθερή περιοχή **Διάγραμμα 2**) ώστε να επαχθεί η ελεγχόμενη αργή ανάπτυξη του κρυστάλλου.[5] Σε υψηλά επίπεδα υπερκορεσμού προκύπτει η ανάπτυξη πάρα πολλών κρυστάλλων μικρότερου μεγέθους.[8]

Ένα μειονέκτημα της τεχνικής της μικροσποράς είναι ότι δεν μπορεί να ελεγχθεί ο αριθμός των πυρήνων που προστίθενται στο διάλυμα κρυστάλλωσης. Για να επιτευχθεί σε κάποιο βαθμό έλεγχος τον εισαγόμενων πυρήνων πραγματοποιείται αραιώση του αρχικού διαλύματος πυρήνων. Συνήθως προστίθεται 1 μl διαλύματος πυρήνων στο διάλυμα κρυστάλλωσης.(**Εικόνα 4**) Όταν υπάρχουν πολλοί πυρήνες στο διάλυμα αναπτύσσονται πολλοί μικρού μεγέθους κρύσταλλοι ενώ όταν η συγκέντρωση των πυρήνων είναι ανεπαρκής η σταγόνα παραμένει καθαρή.[5]

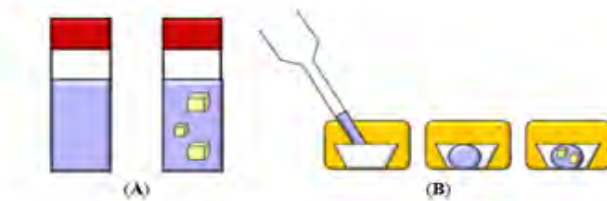
Στην τεχνική της μακροσποράς οι πυρήνες που μεταφέρονται στο διάλυμα κρυστάλλωσης είναι αρκετά μεγάλοι σε μέγεθος. Το μέγεθος τους επιτρέπει τη μεταφορά τους με τη χρήση μικροσκοπίου. Ο κρύσταλλος-πυρήνας περνάει από στάδια πλύσης με διαλύματα μεταφοράς. Αυτό γίνεται ώστε να αποφευχθεί η ψευδής πυρήνωση κατά την οποία μικρά μόρια πυρήνων προσκολλώνται στις επιφάνειες του κρυστάλλου-πυρήνα. Τα στάδια πλύσης που πυρήνα οδηγούν σε περιορισμένη διάλυση του για την ανανέωση των επιφανειών του με σκοπό την άμεση προώθηση της ανάπτυξης κρυστάλλου. [5]



Εικόνα 4: Η τεχνική της μικροσποράς. Αρχικά γίνεται θραύση των κρυστάλλων με τη χρήση γυάλινων σφαιριδίων και στη συνέχεια πραγματοποιείται αραιώση του διαλύματος. [5]

1.4.4 Μέθοδος batch

Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθόδους στις οποίες το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταβαίνει σταδιακά στην κατάσταση υπερκορεσμού, ώστε να έρθει σε ισορροπία με το περιβάλλον του, στη μέθοδο batch ο υπερκορεσμός επέρχεται άμεσα κατά την ανάμειξη των διαλυμάτων. Το δείγμα της πρωτεΐνης αναμιγνύεται με τον καταβυθιστικό παράγοντα και τα κατάλληλα πρόσθετα για να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές μέσο κρυστάλλωσης και σφαγίζεται σε ειδικούς σωλήνες. **(Εικόνα 5A)** Σε ένα πείραμα στατικής μεθόδου δεν υπάρχει διερεύνηση του διαγράμματος φάσης, επειδή οι αρχικές συνθήκες παραμένουν σταθερές για δύο, τρεις εβδομάδες. Το γεγονός αυτό, αφενός είναι θετικό γιατί μας επιτρέπει να γνωρίζουμε επακριβώς τις συνθήκες στις οποίες κρυσταλλώθηκε το σύστημα, αφετέρου όμως για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται να γνωρίζουμε με αρκετή ακρίβεια τις συνθήκες που είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη κρυστάλλων πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί ότι καθώς τα δείγματα δεν εκτίθενται καθόλου στον αέρα κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης, προστατεύονται από τους ρύπους που μπορεί να περιέχει ο αέρας. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι σε πολλές περιπτώσεις η εξισορρόπηση λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό αύξησης των κρυστάλλων και συνεπώς την ποιότητα των κρυστάλλων. Παραλλαγές αυτής της μεθόδου αποτελούν η μέθοδος microbatch με έλαιο και microbatch χωρίς έλαιο. Στις μεθόδους microbatch χρησιμοποιούνται πολύ μικροί όγκοι διαλυμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά τριβλία κρυστάλλωσης ικανά να δεχτούν μικρούς όγκους διαλύματος τα οποία σφαγίζονται με ειδικές ταινίες. Στη μέθοδο με έλαιο η εξάτμιση των σταγονιδίων εμποδίζεται από την προσθήκη ελαίου που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο φάσεων με το διάλυμα κρυστάλλωσης να βρίσκεται κάτω από το έλαιο. **(Εικόνα 5B)**. Στη τεχνική microbatch χωρίς έλαιο η πρωτεΐνη και ο καταβυθιστικός παράγοντας αναμιγνύονται στην τελική τους συγκέντρωση στην αρχή του πειράματος. Η σταγόνα στη συνέχεια αποθηκεύεται παρουσία μιας δεξαμενής με την ίδια συγκέντρωση καταβυθιστικού παράγοντα, για να αποφευχθεί η εξάτμιση της. Η κρυστάλλωση συνήθως συμβαίνει χρησιμοποιώντας το 60% -80% της συγκέντρωσης του καταβυθιστικού παράγοντα που απαιτείται στο πείραμα της μεθόδου κρεμάμενης σταγόνας. Το πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι η εξάλειψη του σημαντικότερου μειονεκτήματος της μεθόδου microbatch υπό έλαιο, δηλαδή η βραδεία εξάτμιση του νερού από τις σταγόνες κρυστάλλωσης που μερικές φορές καταλήγει στο σχηματισμό κρυστάλλων άλατος που παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη των πρωτεϊνικών κρυστάλλων. [4]



Εικόνα 5: (Α) Στατική μέθοδος Batch, (Β) Μέθοδος Microbatch (3)

Άλλες πιο εξειδικευμένες τεχνικές ανάπτυξης κρυστάλλων είναι η ελεύθερη διάχυση διεπιφάνειας (Free Interface Diffusion), η κρυστάλλωση σε πηκτή (Gel Crystallization) και η αντίστροφη διάχυση σε πηκτή (Counter-Diffusion in Gel). [4]

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι: διάχυσης ατμού και συγκεκριμένα η μέθοδος της καθήμενης σταγόνας, η στατική μέθοδος batch, η μέθοδος microbatch καθώς και η τεχνική της μικροσποράς.

1.5 Χαρακτηρισμός αποτελεσμάτων κρυστάλλωσης και ανάλυση

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των πειραμάτων κρυστάλλωσης είναι η ταξινόμηση των αποτελεσμάτων, η οποία μπορεί να γίνει είτε μέσω αυτοματοποιημένων συστημάτων απεικόνισης είτε με τη χρήση ενός απλού στερεοσκοπίου. Παρόλο που τα αυτοματοποιημένα συστήματα απεικόνισης παρέχουν το πλεονέκτημα της εξέτασης πολλών πειραμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα εντούτοις η χειρωνακτική ανάλυση μπορεί να επισημάνει αποτελέσματα που παραλήφθησαν από το αυτοματοποιημένα συστήματα. Η καταγραφή και αρχειοθέτηση των αποτελεσμάτων είναι καθοριστικής σημασίας για την μετέπειτα ανάλυση των αποτελεσμάτων. [10]

Υπάρχει ένα σύνολο αποτελεσμάτων που μπορεί να προσδιοριστεί με σαφήνεια όταν γίνεται παρατήρηση των κρυσταλλογραφικών πειραμάτων μέσω στερεοσκοπίου. Αυτά είναι η δημιουργία καθαρής σταγόνας, ο διαχωρισμός φάσεων, ο σχηματισμός ιζήματος ή δέρματός και η ύπαρξη μη κρυσταλλικών ξένων σωμάτων και φυσικά η ύπαρξη κρυστάλλων. [10]

Καθαρή σταγόνα

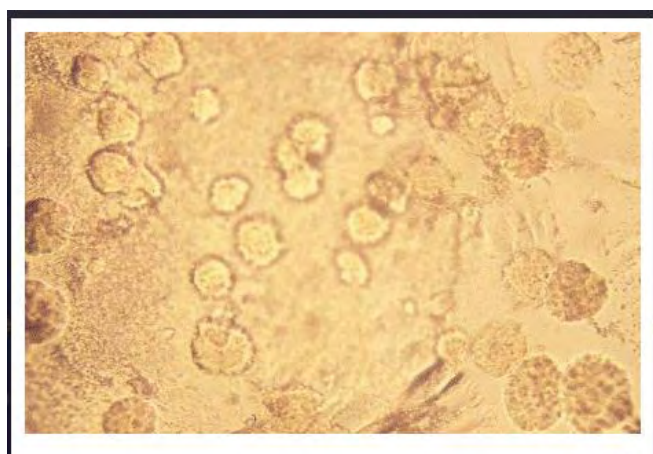
Σε μια καθαρή σταγόνα υπάρχει μόνο η υγρή φάση που δείχνει ότι το δείγμα είναι εντελώς διαλυτό εντός των ορίων του συστήματος απεικόνισης. **(Εικόνα 6.1)** Το διάλυμα μπορεί απλώς να είναι ακόρεστο (μακριά από τις συνθήκες κρυστάλλωσης), αλλά αν οι χημικές συνθήκες είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη κρυστάλλων, τότε το σύστημα μπορεί να βρίσκεται σε μετασταθερή υπερκορεσμένη κατάσταση. Αν και με βάση την εμφάνιση μια καθαρή σταγόνα στην ακόρεστη κατάσταση είναι πανομοιότυπη με μια καθαρή σταγόνα που βρίσκεται στη μετασταθερή ζώνη, ωστόσο ανήκουν σε

δύο διαφορετικές θερμοδυναμικές καταστάσεις. Η πρώτη παρέχει ένα όριο στην ανάπτυξη κρυστάλλων ενώ η δεύτερη αποτελεί κεντρικό σημείο για την ανάπτυξη. Αντίθετα οι απομονωμένες καθαρές σταγόνες μας παρέχουν περιορισμένες πληροφορίες. Πρέπει να δίνει διάκριση μεταξύ σταγόνων στη μετασταθερή κατάσταση και ακόρεστων σταγόνων. Ο πιο απλός τρόπος διάκρισης βασίζεται στη χημική τους εγγύτητα με συνθήκες που οδήγησαν στην ανάπτυξη κρυστάλλων. Οι ακόρεστες συνθήκες θα δίνουν σε μεγάλο βαθμό καθαρές σταγόνες σε συγγενικά χημικά πειράματα. Σε αντιδιαστολή οι συνθήκες της μετασταθερής ζώνης οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα σε συγγενικά πειράματα(σχηματισμός ιζήματος, διαχωρισμός φάσεων, κλπ). [10]

Διαχωρισμός φάσεων

Ο διαχωρισμός φάσεων θεωρείται ως ύπαρξη σταγόνας μέσα σε σταγόνα, μορφές παρόμοιες με αυτές που προκύπτουν από την ανάμιξη λαδιού με ξύδι. **(Εικόνα 6.2, 6.3)** Πειραματικές και θεωρητικές μελέτες καταδεικνύουν το σχηματισμό του μη αναμειξιμού διαχωρισμού φάσης υγρού-υγρού στην μετασταθερή περιοχή του διαγράμματος φάσης. Αυτός ο διαχωρισμός φάσης συμβαίνει μόνο όταν υπάρχουν μικρής εμβέλειας, ή / και εξαιρετικά ανισότροπη αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης. Περαιτέρω πειραματικά στοιχεία καταδεικνύουν ότι αυτή η περιοχή συνδέεται με συνθήκες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη κρυστάλλων. [10]

Ο διαχωρισμό φάσεων είναι μια κατάσταση του διαλύματος που συχνά συγχέεται με τη δημιουργία στη σταγόνα μορφών που καλούνται σφαιρουλίτες(**Εικόνα 7**). Οι σφαιρουλίτες είναι στερεοί και τα άκρα τους δεν είναι στρόγγυλα όπως συμβαίνει με τα υγρά και έλαια στο διαχωρισμό φάσεων. Αυτά είναι δυο χαρακτηριστικά που τους διαχωρίζουν από τις μορφές που εμφανίζει η σταγόνα όταν υφίσταται διαχωρισμό φάσεων. [11]

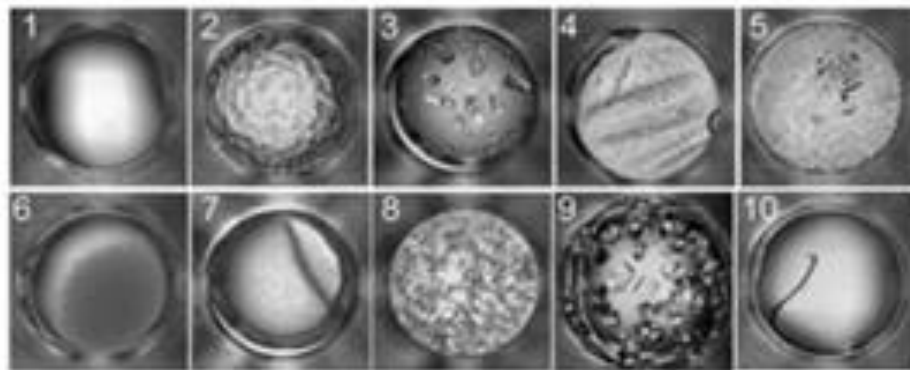


Εικόνα 7: Σφαιρουλίτες [11]

Σχηματισμός ιζήματος

Η κατακρήμνιση (σχηματισμός ιζήματος) υποδεικνύει ότι οι συνθήκες κρυστάλλωσης έχουν οδηγήσει το διάλυμα της πρωτεΐνης σε κατάσταση

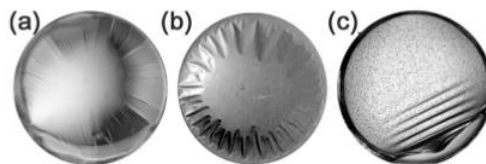
υπερκορεσμού. Αυτό υποδεικνύει ότι οι βιοχημικές συνθήκες έχουν οδηγήσει το δείγμα της πρωτεΐνης σε κατάσταση υπερκορεσμού πέρα από το επίπεδο που απαιτείται για ανάπτυξη μονών κρυστάλλων. Το ίζημα μπορεί να είναι δύο μορφών, κακό (άμορφο) ή καλό (μικροκρυσταλλικό) (Εικόνα 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8). Το άμορφο ίζημα μπορεί να έχει σκούρο καφέ χρώμα, συχνά σχηματίζει δέρμα στην σταγόνα, δεν επαναδιαλυτοποιείται, δεν απορροφά χρωστικές και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα πυρήνων. Το κρυσταλλικό ίζημα είναι η συσσωμάτωση πρωτεϊνών όπου το χημικό περιβάλλον επιτρέπει τη φυσική διαμόρφωση να παραμείνει ανέπαφη και οδηγούν στην ανάπτυξη κρυστάλλων με ελάχιστες δυνατότητες βελτίωσης. Τα κρυσταλλικά ιζήματα έχουν σχήμα, μπορεί να είναι αμμόδη, μπορεί να εμφανίζουν διχρωμία (ανάλογα με τον προσανατολισμό και την συμμετρία των κρυστάλλων), επαναδιαλυτοποιούνται, απορροφούν χρωστική και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διάλυμα πυρήνων. [10]



Εικόνα 6: Τύποι σταγόνων (1) Καθαρή σταγόνα, (2, 3) Διαχωρισμός φάσεων, (4-8) Ίζημα, (9) Κρύσταλλοι, (10) Μη κρυσταλλικό ξένο σώμα

Σχηματισμός δέρματος

Ο σχηματισμός του δέρματος είναι ένα λεπτό στρώμα μετουσιωμένης πρωτεΐνης που κάτω από το στερεοσκόπιο μπορεί να μοιάζει με ένα στρώμα πτυχωτού πλαστικού περιτυλίγματος στην επιφάνεια της σταγόνας. Αυτό το δέρμα μπορεί να απομακρυνθεί από την σταγόνα χρησιμοποιώντας μικροεργαλεία, όπως μια βελόνα, και συχνά έχει μια ομοιομορφία παρόμοια με το ιστό της αράχνης που μπορεί δύσκολα να απομακρυνθεί από τους εύθραυστους κρυστάλλους. Το δέρμα είναι μια μορφή απορρόφησης της πρωτεΐνης στη διεπιφάνεια είτε είναι διάλυμα / έλαιο ή διάλυμα / αέρας, είτε διάλυμα / επιφάνεια όπως τα πλαστικά και γυάλινα υλικά που συνήθως καλύπτουν τη σταγόνα. (Εικόνα 7)

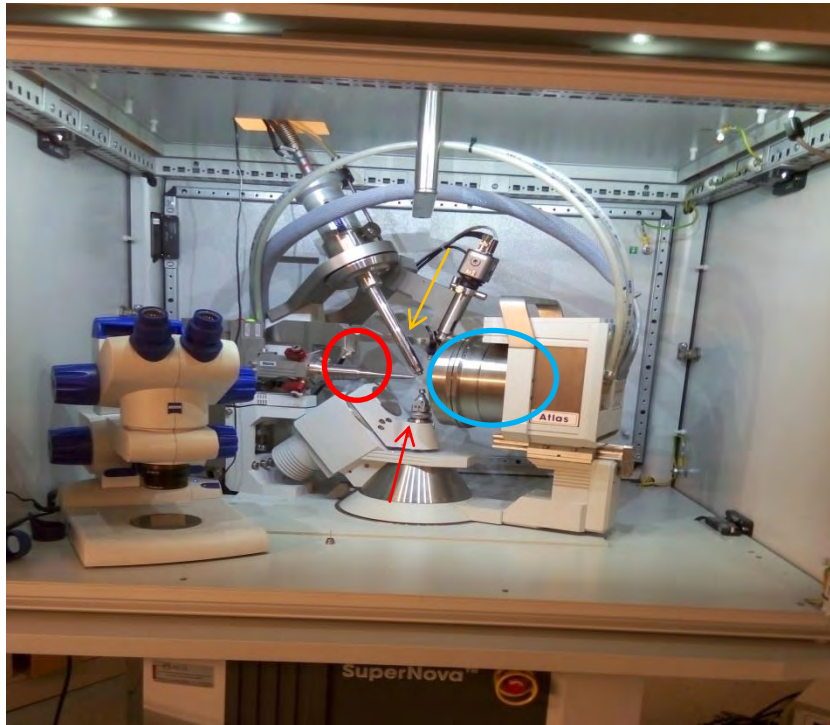


Εικόνα 7: Σχηματισμός δέρματος

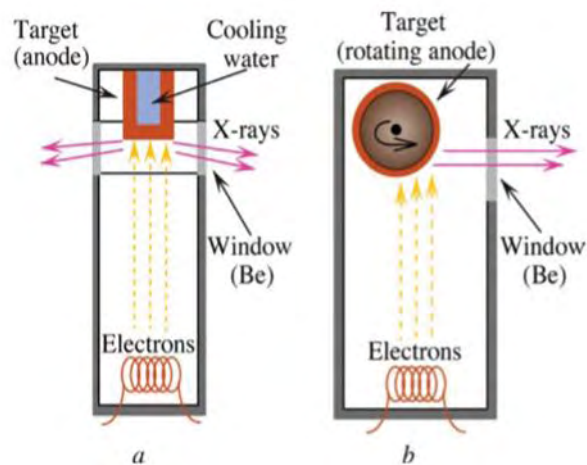
1.6 Πηγές ακτίνων – X και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η ικανότητα των κρυστάλλων να περιθλούν ακτίνες X, οδήγησε στη γέννηση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, που χρησιμοποιεί τα διαγράμματα περίθλασης για την αποκάλυψη των θέσεων των ατόμων μέσα στον κρύσταλλο. Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 0,1-100 Å. Ακτίνες-X στο χρήσιμο εύρος για κρυσταλλογραφία μπορούν να παραχθούν όταν ηλεκτρόνια μεταβαίνουν από μια υψηλότερη σε μια χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Όταν ένα ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας συγκρούεται με ένα άλλο ηλεκτρόνιο οδηγεί στην πτώση του ηλεκτρονίου από το υψηλότερο τροχιακό στην προκύπτουσα θέση, εκπέμποντας την περίσσεια της ενέργειας ως φωτόνιο ακτίνων X. Οι ακτίνες X συγκεκριμένου μήκους κύματος που παράγονται μέσω βομβαρδισμού μιας μεταλλικής πλάκας η οποία ονομάζεται άνοδος (συνηθέστερα χαλκός, μολυβδαίνιο ή χρώμιο) με ηλεκτρόνια που παράγονται από ένα θερμαινόμενο νήμα και επιταχύνεται από το ηλεκτρικό πεδίο είναι γνωστές ως μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X. [12,13]

Υπάρχουν τρεις κοινές πηγές ακτίνων X, οι σωλήνες ακτίνων X (στην πραγματικότητα μια κάθοδος τύπου τηλεοπτικού σωλήνα), περιστρεφόμενοι σωλήνες ανόδου και κυκλικοί επιταχυντές σωματιδίων (Εικόνα 8), οι οποίοι παράγουν ακτινοβολία συγχροτρονίων στην περιοχή των ακτίνων X. Σε ένα σωλήνα ακτίνων X, τα ηλεκτρόνια από ένα καυτό νήμα (κάθοδος) επιταχύνονται από ηλεκτρικά φορτισμένες πλάκες και συγκρούονται με το μέταλλο στόχο (άνοδος) το οποίο ψύχεται μέσω διοχέτευσης νερού (Εικόνα 9a). Οι ακτίνες X παράγονται σε χαμηλές γωνίες από την άνοδο και εξέρχονται από το σωλήνα μέσω παραθύρων βηρυλλίου. [12,13]



Εικόνα 8: Πειραματική διάταξη συμβατικής πηγής ακτίνων-Χ (SuperNova X-ray Diffraction System, Rigaku Oxford Diffraction) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στην Αθήνα. Απεικονίζεται σε κόκκινο κύκλο η πηγή ακτίνων Χ, με κόκκινο βέλος η θέση στερέωσης του κρυστάλλου (γωνιόμετρο), με γαλάζιο κύκλο ο ανιχνευτής και με πορτοκαλί βέλος η αντλία από όπου γίνεται εκροή του υγρού αζώτου. Στα αριστερά βρίσκεται το στερεοσκόπιο.



Εικόνα 9: Πηγές ακτίνων-Χ, a) σωλήνας ακτίνων-Χ, b) πηγή περιστρεφόμενης ανόδου [12]

Η παραγωγή ακτίνων Χ μέσω των σωλήνων είναι περιορισμένη λόγω της ποσότητας της θερμότητας που πρέπει να απαλυφθεί στην άνοδο μέσω του νερού που κυκλοφορεί σε αυτή. Υψηλότερη παραγωγή ακτίνων Χ

επιτυγχάνεται από τις πηγές περιστρεφόμενης ανόδου όπου ο στόχος είναι ένας ταχέως περιστρεφόμενος μεταλλικός δίσκος ώστε να θερμαίνονται διαφορετικές περιοχές του. (Εικόνα 9b). [12]

Οι κυκλικοί επιταχυντές σωματιδίων (κυκλοσυγχροτρόνια ή απλά συγχροτρόνια) αποτελούν τις πιο ισχυρές πηγές ακτίνων Χ. (Εικόνα 10) Στους γιγαντιαίους αυτούς κυκλικούς επιταχυντές, τα ηλεκτρόνια ή τα ποζιτρόνια κινούνται με ταχύτητες που πλησιάζουν την ταχύτητα του φωτός, που οδηγείται από την ενέργεια πομπών ραδιοσυχνοτήτων και διατηρείται σε κυκλική τροχιά από ισχυρούς μαγνήτες. Το σωματίδια αυτά παράγουν πολύ ισχυρή ακτινοβολία σε όλα τα μήκη κύματος, από τις μικρού μήκους κύματος ακτίνες γάμα ως το ορατό φως. Ένα φορτισμένο σώμα όπως ένα ηλεκτρόνιο εκπέμπει ενέργεια (ακτινοβολία synchrotron) όταν ωθείται σε περιστροφική κίνηση, και αυτή η ενέργεια εκπέμπεται ως ακτίνες Χ. Οι βοηθητικές συσκευές που ονομάζονται wigglers προκαλούν επιπλέον κάμψη της δέσμης, αυξάνοντας την ένταση της ακτινοβολίας. Συστήματα κατόπτρων εστίασης και μονοχρωματοποιητών που εφάπτονται στους κυκλικούς επιταχυντές παρέχουν ισχυρές μονοχρωματικές ακτίνες Χ σε επιλέξιμα μήκη κύματος, αρκετά πιο ισχυρές συγκριτικά με αυτές που παράγονται από συμβατικές πηγές. Αυτό παρέχει το πλεονέκτημα συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων από μικρού μεγέθους κρυστάλλους (50μm ή/και μικρότερους). Το περιθλασίγραμμα που προκύπτει είναι μεγαλύτερης ευκρίνειας και συνεπώς οδηγεί σε πιο ακριβείς δομές. [12,13]

Οι πολυχρωματικές δέσμες ακτίνων-Χ παράγονται χρησιμοποιώντας ειδικό εξοπλισμό ο οποίος επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολίας ακτίνων-Χ με μήκη κύματος από 0,2-2,0 Å και οι πηγές συγχροτρόνων είναι διαθέσιμες μόνο στους κυκλικούς επιταχυντές σωματιδίων εντούτοις αυτές οι έντονες δέσμες έχουν πολλά πλεονεκτήματα. Δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ που απαιτούν πολλές ώρες έκθεσης σε μια συμβατική πηγή μπορούν να ληφθούν σε δευτερόλεπτα ή λεπτά σε μια πηγή συγχροτρόνου.

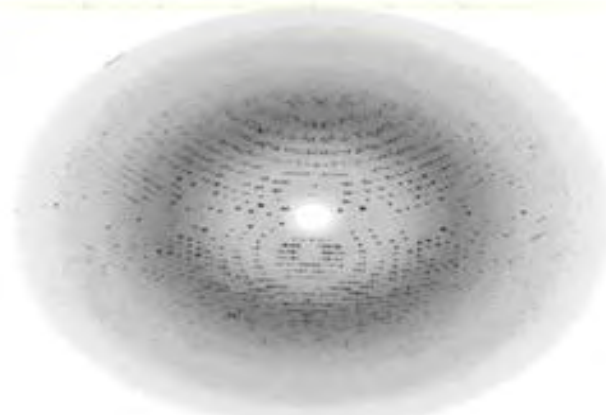
Οι ανακλάσεις που προκύπτουν από την έκθεση του κρυστάλλου σε ακτινοβολία ακτίνων Χ καταγράφονται από ανιχνευτές. Υπάρχουν πολλοί τύποι ανιχνευτών οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι ανιχνευτές συσκευές συζευγμένου φορτίου (CCD). Οι εντάσεις της ανάκλασης μπορούν να μετρηθούν μέσω μετρητών σπινθηρισμού, οι οποίοι μετρούν τα φωτόνια των ακτίνων Χ. Τα δεδομένα μεταφέρονται απευθείας στον υπολογιστή όπου γίνεται η σύνθεση και επεξεργασία του περιθλασιγράμματος. Ο τρόπος λειτουργίας των μετρητών σπινθηρισμού βασίζεται στο φωσφορίζον υλικό που περιέχουν. Το υλικό αυτό παράγει λάμψη φωτός όταν απορροφά ένα φωτόνιο ακτίνων Χ. Οι λάμψεις που προκύπτουν μετρούνται από ένα φωτοκύτταρο. Η κρυσταλλογραφία μακρομορίων απαιτεί μέσα για τη συλλογή πολλών ανακλάσεων ταυτόχρονα. [12]

Τα τελευταία χρόνια ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται συσκευές συζευγμένου φορτίου (CCD) που χρησιμεύουν στη μέτρηση φωτονίων. Τα CCD αποτελούν

στερεοστατικές συσκευές οι οποίες συσσωρεύουν ηλεκτρόνια αναλογικά με την ποσότητα του φωτός που δέχονται μέσω της ακτινοβολίας. Ένα προσπιπτόν φωτόνιο αναγκάζει ένα ηλεκτρόνιο να μεταβεί σε μια υψηλότερη κατάσταση ενέργειας επιτρέποντας του να κινηθεί και να παγιδευτεί μέσα σε μια θετικά φορτισμένη περιοχή στο κέντρο του εικονοστοιχείου (Εικόνα 11). Τα δεδομένα μεταφέρονται στον υπολογιστή μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας επομένως οι ανιχνευτές CCD δεν παρασιάζουν κάποιο όριο στο ρυθμό μέτρησης των φωτονίων καθώς στερούνται νεκρού χρόνου.[12]



Εικόνα 10: Συγχροτρονική πηγή ακτίνων-Χ της εταιρίας ESRF Grenoble



Εικόνα 11: Περιθλασίγραμμα που προέκυψε από περίθλαση ακτινών Χ κρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. [14]

1.7 Συστήματα Robot και κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης(High-throughput)

Η κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Έχει επιτευχθεί αρκετά μεγάλη πρόοδος των μέσων για άμεση και αποτελεσματική συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στα συστήματα robot και μικροέγχυσης έδωσε τη δυνατότητα διερεύνησης συνθηκών κρυστάλλωσης με αρκετά μικρή ποσότητα πρωτεΐνης, λίγα μόνο χιλιοστόγραμμα (mg) είναι απαραίτητα για τη διερεύνηση εκατοντάδων συνθηκών. (Εικόνα 12) Η ανάπτυξη και η εφαρμογή της εργαστηριακής ρομποτικής κατέστησε εφικτή την κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης. Γι' αυτό το λόγο, έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένα συστήματα και όργανα για την επιτάχυνση της διαδικασίας της κρυστάλλωσης. Τα robot κρυστάλλωσης είναι ικανά να διερευνούν με ακρίβεια και αξιοπιστία χιλιάδες συνθήκες κρυστάλλωσης. Η χρήση τους περιορίζει τον αριθμό των λαθών στον ελάχιστον δυνατό. Τα πλεονεκτήματα που διαθέτουν έναντι των ανθρώπων είναι ότι τα robot είναι ακούραστα, ακριβή και αποτελεσματικά. Το πιο σημαντικό όμως πλεονέκτημα είναι ότι χρησιμοποιούν πολύ μικρές ποσότητες βιολογικού δείγματος για την πραγματοποίηση πολυάριθμων δοκιμών. Συνήθως αναπτύσσουν σταγόνες όγκου της τάξης των μικρολίτρων, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις και νανολίτρων. Ωστόσο, η τεχνική με την οποία λειτουργεί το robot γιγαντώνει τις απαιτήσεις για αυτοματοποιημένα όργανα μικροφωτογραφίας, αποθήκευσης και χειρισμού. Οι εγκαταστάσεις υψηλής απόδοσης χρησιμοποιούν επί του παρόντος οπτικά συστήματα και κάμερες για να ελέγχουν ρομποτικά και περιοδικά τα δείγματα και να αποθηκεύουν αρχεία εικόνων. [5] Στις σύγχρονες υποδομές συγχροτρονιακής ακτινοβολίας αναπτύσσονται νέες τεχνικές αιχμής για τη συλλογή δεδομένων υψηλής απόδοσης.

Στα αυτοματοποιημένα συστήματα κρυσταλλογραφίας περιλαμβάνονται ειδικά ρομπότ που επιτρέπουν τη μαζική σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης ενώ έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένα συστήματα επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων (crystal to model) με δυνατότητα ανάλυσης πάνω από 1000 κρυστάλλων την εβδομάδα. Τα συστήματα αυτά απαιτούν ανάπτυξη κρυστάλλων σε τριβλία κρυσταλλώσεων συγκεκριμένου format σχεδιασμένα τα περισσότερα από αυτά για ανάπτυξη κρυστάλλων με τη μέθοδο διάχυσης ατμών ή τη μέθοδο microbatch.



Εικόνα 12 : Robot OryxNano Douglas Instruments

1.8 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (E.C 2.4.1.1) είναι το πιο καλά μελετημένο ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου καθώς καταλύει την φωσφορλυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης (Glc-1-P). [15]



Υπάρχουν τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης στα θηλαστικά που κωδικοποιούνται από 3 γονίδια PYGL, PYGM και PYGB και πήραν το ονομά τους από τους ιστούς στους οποίους εκφράζονται. Οι τρεις ισομορφές είναι οι ακόλουθες [16]:

- ✓ Φωσφορυλάση του γλυκογόνου του ήπατος
- ✓ Φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών
- ✓ Φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου

Κάθε ισομορφή έχει ένα ξεχωριστό φυσιολογικό ρόλο: η μυϊκή ισόμορφη παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για τη σύσπαση των μυών μέσω παραγωγής ATP που προέρχεται από γλυκόζη, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη σε καταστάσεις που επείγει η παροχή γλυκόζης όπως κατά τη διάρκεια περιόδων ανοξίας ή σοβαρής υπογλυκαιμίας. Η ηπατική ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης στο αίμα από το γλυκογόνο που βρίσκεται αποθηκευμένο στο ήπαρ. Η ισόμορφη του ήπατος είναι η κύρια ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που εμπλέκεται στην ομοίωση της γλυκόζης.

Οι διαφορές μεταξύ των ιστοειδικών ισομορφών είναι αποτέλεσμα της διαμόρφωσης, απώλειας ή κέρδους, της αλλοστερικής ρύθμισης [17], ωστόσο υπάρχει ένας υψηλός βαθμός ομολογίας μεταξύ των αλληλουχιών αμινοξέων των τριών ισομορφών, ιδιαίτερα σε κατάλοιπα κοντά στα καταλυτικά και αλλοστερικά κέντρα, με ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών περίπου 80% μεταξύ των ανθρώπινων ισομορφών. [18] Επίσης, υπάρχει υψηλή ομολογία αλληλουχίας, περίπου 97%, μεταξύ των ανθρώπινων και αντίστοιχων ισομορφών των τρωκτικών. [16]

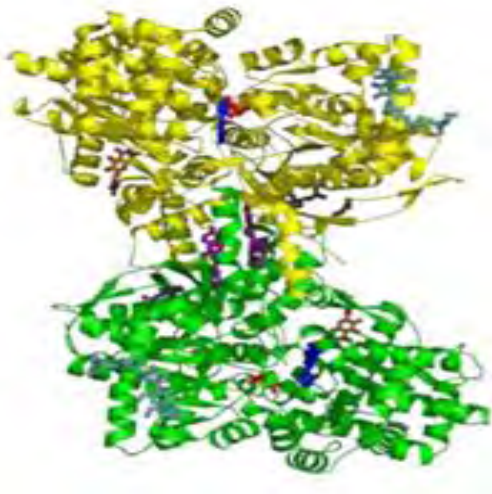
1.8.1 Γενική περιγραφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη η οποία μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις, ανάλογα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης του ενζύμου και την παρουσία ή απουσία διαφόρων προσδεμάτων. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kD η κάθε μία. [18] Η φωσφορυλάση του μυός περιέχει 841 αμινοξικά κατάλοιπα, η ηπατική 846 και η φωσφορυλάση του εγκεφάλου αποτελείται από 862 αμινοξικά κατάλοιπα. Περιέχει επίσης το συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μια λυσίνη (Lys680) μέσω μια βάσης Schiff. [19]

Κάθε μονομερές διαιρείται σε δυο περιοχές: την αμινοτελική και την καρβοξυτελική. Η αμινοτελική περιοχή αποτελεί και τη μεγαλύτερη περιοχή κάθε υπομονάδας και περιέχει διάφορες ρυθμιστικές περιοχές. Η αμινοτελική περιοχή περιέχει επίσης και την θέση ενεργοποίησης, τη θέση αλλοστερικής ρύθμισης στην οποία συνδέεται η AMP, καθώς και άλλοι προσδέτες όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη, η ATP και η 1-φωσφορική φρουκτόζη. Μια επιπλέον ρυθμιστική περιοχή είναι η Ser-14, βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 5 και 22 του ενζύμου και μπορεί να τροποποιηθεί με φωσφορυλίωση. Επίσης, η αμινοτελική περιοχή διαθέτει τη θέση αποθήκευσης του γλυκογόνου και το κέντρο αναστολής. Στη καρβόξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας είναι δεσμευμένη η φωσφορική πυριδοξάλη στην Lys680 με μια βάση Schiff μέσω της αλδεϋδικής της ομάδας. Η φωσφορική πυριδοξάλη βρίσκεται δίπλα στο ενεργό κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή με μήκος 15Å και σχηματίζεται με κατάλοιπα και από τις αμινοτελικές και από τις καρβοξυ-τελικές δομικές περιοχές. Το ενεργό κέντρο καλύπτεται από μία κινητή πύλη που σχηματίζεται από κατάλοιπα της αμινο-τελικής περιοχής (βρόχος 280s). Στην επιφάνεια του ενζύμου και στην αρχή του καναλιού για το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το κέντρο αναστολής. Τέλος, η θέση πρόσδεσης του ινδολίου βρίσκεται κοντά στο κέντρο του ενζύμου δηλαδή κοντά στη σύνδεση με την άλλη υπομονάδα.

Συνοψίζοντας, κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης (**Εικόνα 13**):

- το καταλυτικό κέντρο
- το αλλοστερικό κέντρο
- το νέο αλλοστερικό κέντρο
- το κέντρο αναστολής
- τη θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου και
- τη θέση πρόσδεσης της κερσετίνης [16,,17,19,20].



Εικόνα 13 : Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπου φαίνονται κέντρα πρόσδεσης. Γαλάζιο: κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου. Μπλε: κέντρο αναστολής. Κόκκινο: καταλυτικό κέντρο. Μοβ: νέο αλλοστερικό κέντρο. Γκρι: αλλοστερικό κέντρο. Καφέ: θέση πρόσδεσης κερσετίνης.

1.8.2 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος ανάπτυξης φαρμάκων κατευθυνόμενων από τη δομή

Παρ' όλο που η διαθεσιμότητα πολλών και διαφορετικών υπογλυκαιμικών φαρμάκων είναι μεγάλη, τα θεραπευτικά σχήματα είναι τις περισσότερες φορές ανίκανα να πετύχουν έναν ικανοποιητικό βαθμό ελέγχου της γλυκόζης στο αίμα ώστε να επιτύχουν μια πιο αποτελεσματική μείωση των επιπτώσεων και της σοβαρότητας των επιπλοκών του διαβήτη. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί φαρμακευτικό στόχο με σκοπό τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα, στόχο αποτελεί η ισομορφή του ήπατος αφού ρόλος της είναι η ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, αποικοδομώντας το γλυκογόνο και απελευθερώνοντας γλυκόζη στην κυκλοφορία του αίματος. Αντίθετα, η μυϊκή φωσφορυλάση λειτουργεί με σκοπό την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυϊκών κυττάρων κατά τη σύσπαση. [21] Η ανακάλυψη, λοιπόν, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από φυσικές πηγές ή η ανάπτυξη συνθετικών αναστολέων με σκοπό την αναστολή της δράσης του ενζύμου αποτελεί ένα βασικό βήμα για την αντιμετώπιση του διαβήτη. Οι πιο διαδεδομένοι και ευρέως μελετημένοι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι τα ανάλογα της γλυκόζης που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. [17]

Η έρευνα της επιστημονικής κοινότητας είναι προσηλωμένη στην εύρεση ενός αναστολέα ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης θα δρα όμως σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή , χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. [22]

Επιπλέον μελέτες έχουν υπογραμμίσει η ρόλο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στον καρκίνο. Είναι συνετό λοιπόν να αποτελέσει στόχο για την ανάπτυξη της αντικαρκινικής θεραπείας καθώς η αναστολή της κινητικότητας του ενζύμου μέσω αποσιώπησης της ηπατικής του ισομορφής σε ποικίλες καρκινικές κυτταρικές σειρές οδήγησε στην εξάλειψη των όγκων καθώς και στην αναστολή αναπτυξής τους. [3]

2 Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου της Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα σημαντικό μεταβολικό ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο της γλυκογονικής διάσπασης. Η συσχέτιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου με πλήθος μεταβολικών διαταραχών κατέστησε την φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων ενάντια σε ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και ο καρκίνος [23,24]

Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες αναγνώρισαν αρκετά κέντρα σύνδεσης μικρών μορίων στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης του ενζύμου έχουν αναγνωριστεί εδώ και αρκετά χρόνια και οδήγησαν σε επιτυχημένα κρυσταλλογραφικά πειράματα αναγνώρισης προσδετών (ligand bind studing). Ωστόσο η διερεύνηση ισχυρών αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καθιστά αναγκαία τη μαζική σάρωση βιβλιοθηκών φυσικών και συνθετικών ενώσεων. Επιπροσθέτως, η εφαρμογή νέων στρατηγικών για την αναγνώριση νέων βιοδραστικών μορίων (Fragment Based Drug Designe) καθιστά αναγκαία τη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθούν νέες συνθήκες κρυστάλλωσης του ενζύμου συμβατές με τα μοντέρνα συστήματα αυτοματοποιημένης κρυστάλλωσης υψηλής απόδοσης. Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης του ενζύμου με τη στατική μέθοδο batch επέτρεψε την μελέτη των συμπλόκων προσδετών-ενζύμου σε υψηλή ευκρίνεια. Εντούτοις, η τεχνική αυτή δεν είναι απόλυτα συμβατή με τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα συστήματα κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης.

3 Πειραματικό Μέρος

3.1 Υλικά-Όργανα

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate, AMP	Sigma
Pre-Crystallization Test	Hampton Research
BES, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)taurine	Sigma
1,4-Dithiothreitol, DTT	Applichem
Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA	Panreac
Imidazole	Aldrich
Inosine Monophosphate IMP	Sigma
JBScreen Basic 1,2,3,4	Jena Bioscience
Löffler's Methylene Blue Solution	Merck
Parafin oil	Applichem
2-Propanol	Applichem
Sodium acetate	Merck
Sodium Azide, NaN ₃	AllieSignal
Sodium citrate	Sigma
Sodium HEPES	Sigma
Structure Screen 1&2 HT-96 MD30	Molecular Dimensions
Spermine	Sigma

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια

Όργανα

Αναδευτήρας τύπου Vortex, MS2 minishakerIKA®
Αναλυτικός ζυγός, Kern
Θερμαινόμενος αναδευτήρας, (Stirrer), Thermolyne
Μεμβράνες διαπίδυσης Sigma
Πιπέτες, Lab Mate
Πεχάμετρο, Metrohm
Robot κρυσταλλώσεων, OryxNano Douglas Instruments
Στερεοσκόπιο
Συμβατική πηγή ακτίνων-Χ, SuperNovaX-rayDiffractionSystem, RigakuOxfordDiffraction
Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου Swissci 'MRC' twodropplatesSW2T-PS/1-10 Douglas Instruments
Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου Swissci 'MRC' two drop plates SW2T-PS/1-10 Douglas Instruments
Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας
Φασματοφωτόμετρο UV, VWR
Φυγόκεντρος Z36HK, HermLe

Πίνακας 3: Οργανολογία

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογονου b από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*

Η μέθοδος απομόνωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιών (*Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b, rmGPb*) αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου Fisher and Krebs (Meth in Enzymology Vol V, p 369-373, 1962). Αντί για L-κυστεΐνη χρησιμοποιείται 2-μερκαπτο-αιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας καθαρισμού.

Υλικά

- Μυϊκός ιστός κουνελιών
- Μαχαίρι, ξύλινη βάση (τοποθέτηση σε ψυκτικό θάλαμο την προηγούμενη της έναρξης της διαδικασίας απομόνωσης του ενζύμου)
- Δοχεία 20 Lt
- Γάζα
- Υαλοβάμβακας
- Μεγάλους σωλήνες (tube) φυγοκέντρησης (τοποθετημένα σε ψυκτικό θάλαμο)
- Αντλία κενού
- Χάρτινα φίλτρα
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Μικρούς σωλήνες (tube) φυγοκέντρησης
- Ογκομετρικός κύλινδρος 2 Lt
- Διάλυμα οξικού οξέος CH₃COOH 1N
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα θειικού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6 M (Κατά την καταβύθιση η συγκέντρωση είναι 41%)
- Διάλυμα Tris 2.0 M (χωρίς ρύθμιση του pH)
- Διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0 M, pH 7.0
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλη, /HCl, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA, 0.5 mM -διθειοθρεϊτόλη)
- Γλυκερόλη 100%

Τα βήματα της απομόνωσης της rmGPb είναι τα εξής:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή του μυϊκού ιστού, κατεργασία για την εκχύλιση του ενζύμου

Αρχικά έγινε λήψη και ομογενοποίηση των σκελετικών μυών κονίκλων. Το ομογενοποίημα τοποθετείται απευθείας σε πάγο. Το βάρος του ιστού ήταν (2,300 kg) Μετά την ομογενοποίηση, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με απιονισμένο ύδωρ, εν ψυχρώ, τρεις φορές με συνολικό χρόνο εκχύλισης τα 30 λεπτά. Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις έγιναν με όγκο απιονισμένου ύδατος ίσο με το βάρος του αλεσμένου μυϊκού ιστού, ενώ κατά την τρίτη εκχύλιση ο όγκος του απιονισμένου ύδατος ήταν ίσος με το μισό του συνολικού βάρους του αλεσμένου κρέατος. Η διάρκεια της κάθε εκχύλισης αντιστοιχούσε σε 10 λεπτά και η διήθηση του εκχυλίσματος έγινε μέσω διλπής γάζας. Εν συνεχεία, το εκχύλισμα διηθήθηκε μέσω υαλοβάμβακα προς απομάκρυνση τυχόν αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση για την κατακρήμνιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος που παραλήφθηκε από το πρώτο βήμα ρυθμίστηκε σε 5,1-5,2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1 N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφέθηκε για 5 λεπτά σε πάγο. Η θολερότητα του διαλύματος του εκχυλίσματος αυξάνεται λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών των οποίων το ισοηλεκτρικό σημείο είναι κοντά στην τιμή 5,2 και άρα είναι αδιάλυτες σε αυτό. Επίσης η θολερότητα οφείλεται στην μετουσίωση πρωτεϊνών. Το πρωτεϊνικό ίζημα των καταβυθισμένων πρωτεϊνών απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C , σε 4.225 rcf (ή 5.000 rpm) για 30 λεπτά, με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διήθηση του υπερκλειμένου υγρού με τη χρήση αντλίας κενού τύπου Buchner, εν ψυχρώ, με στόχο την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Τέλος, το pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 6,8 με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος KHCO_3 . Η ρύθμιση του pH (6,8) γίνεται στην τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με διάλυμα 90% w/v θειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Η καταβύθιση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε, με αργή και υπό συνεχή ανάδευση, προσθήκη διάλυμα θειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 6,8. Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου για τη διαδικασία της καταβύθισης ήταν ίσος με 0,837 επί του συνολικού όγκου του

εκχυλίσματος (4220 mL). Η ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου σε 6,8 έγινε με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH₄OH) με τη χρήση πεχαμετρικού χαρτιού σε απαγωγό. Το μίγμα του πρωτεϊνικού διαλύματος με το διάλυμα θειικού αμμωνίου αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο (4°C) για 16 ώρες. Το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C σε 5.110 rcf (ή 5.500 rpm) επί 40 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος ακολούθησε διαπίδυση του διαλυτοποιημένου ενζύμου σε μεμβράνες διαπίδυσης, οι οποίες εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris συγκέντρωσης 0.001 M και pH 7,5 στον ψυκτικό θάλαμο όπου και παρέμειναν για 16 ώρες υπό ανάδευση.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά το πέρας της διαπίδυσης έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος και πραγματοποιήθηκε διαύγαση με φυγονέντρηση σε 34.540 rcf (ή 17.000 rpm για 10 λεπτά) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Έπειτα, συλλέχθηκε και ογκομετρήθηκε το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί προσθήκη πρόσφατου διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης συγκέντρωσης 0,3 M με pH 7,0 και διαλύματος EDTA συγκέντρωσης 0,1 M με pH 7,0. Οι όγκοι των διαλυμάτων υπολογίστηκαν από τους τύπους που ακολουθούν:

- Όγκος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0,3 M = πρωτεϊνικός όγκος $\times \frac{3}{27}$
- Όγκος EDTA 0.1 M = πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος της 2-μερκαπτοαιθανόλης $\times \frac{5}{1000}$

Έπειτα, ρυθμίστηκε το pH σε τιμή 8,8 με την προσθήκη διαλύματος Tris συγκέντρωσης 2 M. Ακολούθησε επώαση του μίγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Εν συνεχεία, το μίγμα παρέμεινε για 15 λεπτά να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και ρυθμίστηκε το pH στην τιμή 7,0 με τη χρήση διαλύματος CH₃COOH συγκέντρωσης 1N. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf (ή 17.000 rpm) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Στο βήμα αυτό πραγματοποιήθηκαν μια κρυστάλλωση και δύο ανακρυσταλλώσεις του ενζύμου παρουσία AMP και (CH₃COO)₂Mg. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμα ανακρυσταλλώσεις χωρίς την προσθήκη αυτών των δύο διαλυμάτων.

- Κρυστάλλωση
 Το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση ογκομετρήθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν το AMP συγκέντρωσης 0,1 M και pH 7,0 και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ με pH 7,0. Οι όγκοι των διαλυμάτων υπολογίστηκαν από τους τύπους που ακολουθούν.
 - Διάλυμα AMP 0.1 M, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος $\times \frac{1}{100}$
 - Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1 M, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος $\times \frac{1}{100}$
 Μετά την προσθήκη το διάλυμα παρέμεινε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μια νύχτα με σκοπό την κρυστάλλωση του ενζύμου.
- 1^η και 2^η ανακρυστάλλωση
 Αρχικά, συλλέχθηκαν οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα επαναδιαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (50 mM β-φωσφογλυκερόλη, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA), pH 6,8 σε θερμοκρασία 30°C εντός υδατόλουτρου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ογκομετρήθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:
 - Διάλυμα AMP 0.1 M, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος $\times \frac{1}{100}$
 - Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1 M, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος $\times \frac{1}{100}$
 Μετά την προσθήκη το διάλυμα παρέμεινε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες ώστε να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση. Μετά το πέρας των 4 ωρών επαναλήφθηκε η διαδικασία της 1^{ης} ανακρυστάλλωσης και το μίγμα αφέθηκε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο όλη τη νύχτα. Έτσι έλαβε χώρα η 2^η ανακρυστάλλωση.
- 3^η και 4^η ανακρυστάλλωση
 Για να πραγματοποιηθεί η 3^η και 4^η ανακρυστάλλωση επαναλήφθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για την 1^η ανακρυστάλλωσης με τη διαφορά ότι στην 3^η και στην 4^η δεν έγινε προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Μετά το πέρας της τελευταίας ανακρυστάλλωσης ελήφθησαν και διαλυτοποιήθηκαν οι κρύσταλλοι. Η συγκέντρωση του τελικού ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm. Τέλος, για την αποθήκευση του ενζύμου προστέθηκε ίσος όγκος

γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους -20°C. Η τελική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο διάλυμα είναι 50 % v/v.

Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης

ΥΛΙΚΑ

- Μεμβράνες
- Ποτήρι ζέσεως 1L
- Na₂CO₃
- EDTA
- dH₂O

1. Κόβουμε τη μεμβράνη στο μήκος που θέλουμε. Στην συνέχεια ζυγίσαμε 6.5 gNa₂CO₃ και 2.44 gEDTA για την προετοιμασία 650 mL διαλύματος. Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετήθηκαν στο παραπάνω διάλυμα και αφέθηκαν να βράσουν για 30 min. Έπειτα τα σακουλάκια ξεπλύθηκαν πολύ καλά με απιονισμένο H₂O. Ακολούθησε βρασμός των μεμβρανών διαπίδυσης σε απιονισμένο H₂O και για 30 min. Αφού ξεπλύθηκαν πολύ καλά αποθηκεύονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C

Να σημειωθεί ότι για τον έλεγχο της καθαρότητας τη πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, SDS-PAGE, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό βάρος τους. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης βρέθηκε μεγαλύτερη από 97%. Ο έλεγχος της καθαρότητας έγινε καθώς η καθαρότητα του δείγματος της πρωτεΐνης είναι συγκαταλέγεται στους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών. Συνήθως για να αναπτυχθούν πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι πρέπει η καθαρότητα να ανέρχεται στο 97%. [13]

3.2.2 Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για κρυστάλλωση

Η πρωτεΐνη που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη κρυστάλλων πρέπει να είναι απαλλαγμένη από το AMP. Πρακτικά η διαδικασία είχε ως εξής:

Μικρή ποσότητα πρωτεΐνης (1 ml), αποθηκευμένη σε γλυκερόλη στους -20°C, μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 20.000. Η μεμβράνη βρισκόταν αποθηκευμένη σε καθαρή αιθανόλη στους 4°C και για αυτό το λόγο ξεπλύθηκε με απιονισμένο ύδωρ. Η πρωτεΐνη υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος BES (10 mM BES pH 6,7, 0,1 mM EDTA, 0,02% NaN₃) με όγκου 250 ml. Η διαδικασία της διαπίδυσης έγινε σε θερμοκρασία 20°C με τη χρήση αναδευτήρα και είχε διάρκεια 16 ώρες. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη συλλέχθηκε και περάστηκε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,22 nm. Έπειτα, έγινε κατεργασία με ενεργό άνθρακα (Activated Charcoal) ώστε να

απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια (AMP). Μετά το πέρας της κατεργασίας με τον ενεργό άνθρακα μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Ο λόγος των απορροφήσεων (A_{260} / A_{280}) πρέπει να είναι μικρότερος από 0,53 (<0,53). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης τη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι $1,32 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$. Σε περίπτωση που ο λόγος των απορροφήσεων (A_{260} / A_{280}) είναι μεγαλύτερος από 0,53 επαλαμβάνεται η διαδικασία κατεργασίας με ενεργό άνθρακα.

3.2.3 Παραγωγή πυρήνων κρυστάλλωσης

Για την παραγωγή πυρήνων κρυστάλλωσης (seeding) χρησιμοποιήθηκαν κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από προηγούμενα πειράματα. Οι κρύσταλλοι των προηγούμενων πειραμάτων αναπτύχθηκαν με τη στατική μέθοδο batch και ήταν αποθηκευμένοι στους 16°C . Σε ένα σωλήνα τύπου falcon τοποθετήθηκαν γυάλινα σφαιρίδια το οποία ήταν αποθηκευμένα σε αιθανόλη. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με διάλυμα BES (10 mM BES με pH 6,7, 0,1 mM EDTA, 0,02% NaN_3). Στο σωλήνα falcon προστέθηκαν επίσης οι κρύσταλλοι που περιέχονταν σε δυο μικρούς σωλήνες διαμέτρου 2-3mm καθώς και διάλυμα BES (10 mM BES με pH 6,7, 0,01 mM EDTA, 0,02% NaN_3). Ακολούθησε φυγοκέντρηση, προκειμένου να σπάσουν οι κρύσταλλοι, σε 4.000 rpm στους 20°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να σπάσουν όλοι οι κρύσταλλοι. Έπειτα, έγινε αρίθμηση σε 11 σωληνάκια από το 10^0 μέχρι το 10^{-10} . Αρχικά γίνεται ανάδευση του πυκνού διαλύματος (10^0) του σωλήνα falcon με τη χρήση αναδευτήρα τύπου Vortex. Στη συνέχεια, με κομμένη την άκρη του tip και υπό ανάδευση ελήφθησαν 200 μl και τοποθετήθηκαν στο σωληνάκι με την ένδειξη 10^0 , αυτό θα είναι το πυκνό διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Σε κάθε ένα σωληνάκι (10^{-1} - 10^{-10}) έγινε προσθήκη 900 μl διαλύματος BES (10 mM BES pH 6,7, 0,1 mM EDTA, 0,02% NaN_3). Έπειτα ελήφθησαν 100 μl από το πυκνό διάλυμα (10^0) υπό ανάδευση με κομμένο tip και μεταφέρθηκαν στο σωληνάκι με την ένδειξη 10^{-1} , το οποίο περιείχε ήδη διάλυμα BES (10 mM BES pH 6,7, 0,1 mM EDTA, 0,02% NaN_3). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες εννιά φορές για την αραιώση του πυκνού διαλύματος πυρήνων. Η αραιώση που γίνεται κάθε φορά είναι της τάξης του $\frac{1}{10}$. Τα σωληνάκια καλύφθηκαν αμέσως με parafilm και παρατηρήθηκαν κάτω από το στερεοσκόπιο. Τέλος αποθηκεύτηκαν στους 16°C .

3.2.4 Κρυστάλλωση rmGPb με τη στατική μέθοδο Batch

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών βασίζεται στην αργή και ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης σε συνθήκες που δεν οδηγούν στην μετουσίωση και τη δημιουργία άμορφου ιζήματος αλλά στην ανάπτυξη κρυστάλλων. Η μέθοδος batch αποτελεί την κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι υψηλής ποιότητας της rmGPb (T διαμόρφωση) αναπτύσσονται παρουσία IMP, DTT, σπερμίνης σε χαμηλή ιοντική ισχύ. (Εικόνα 14) [25,26] Οι κρύσταλλοι αυτοί ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας χώρου $P4_32_12$ και έχουν διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας $a=b=128.5 \text{ \AA}$ και $c=116.3 \text{ \AA}$. [27] Σε αυτή τη μέθοδο ο υπερκορεσμός επέρχεται άμεσα σε αντίθεση με άλλες μεθόδους κρυστάλλωσης όπου το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταβαίνει σταδιακά σε κατάσταση υπερκορεσμού, προκειμένου να έρθει σε ισορροπία με το περιβάλλον. Το ενζυμικό διάλυμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όγκου 202 μl, το οποίο είναι απαλλαγμένο από το AMP μετά από κατεργασία του με ενεργό άνθρακα, αναμιγνύεται με το διάλυμα πυρήνων συγκέντρωσης 10^{-5} και όγκου 20 μl που προστέθηκαν με κομμένο tip, δημιουργώντας μια υψηλή κατάσταση κορεσμού. Έπειτα, το μίγμα των διαλυμάτων μεταφέρθηκε σε μικρούς σωλήνες μήκους 3 cm και διαμέτρου 2-3mm, τα άκρα του σωλήνα σφραγίστηκαν με parafilm. Οι κρύσταλλοι αρχίζουν να αναπτύσσονται 4-5 ώρες στους 16°C και συνεχίζεται για εβδομάδες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί ότι το ένζυμο είναι ικανό να παράγει κρυστάλλους, ώστε να αποκλειστεί η περίπτωση αδυναμίας κρυστάλλωσής του κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων με την χρήση robot κρυσταλλώσεων (OryxNano Douglas Instruments) μέσω της μεθόδου της καθήμενης σταγόνας.



Εικόνα 14:
Τετραγωνικοί
κρύσταλλοι GP [14]

3.2.5 Κρυστάλλωση rmGPb με την τεχνική Microbatch

Η τεχνική κρυστάλλωσης microbatch βασίζεται στην τεχνική της στατικής μεθόδου batch. Πιο συγκεκριμένα αποτελεί μικρογραφία

της μεθόδου batch όπου το μίγμα των διαλυμάτων ενζύμου-διαλύματος εξισορρόπησης εμβαπτίζεται σε ένα αδρανές έλαιο. Η χρήση του ελαίου γίνεται προς αποφυγή εξάτμισης του δείγματος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές της συγκεκριμένης μεθόδου και το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το έλαιο παραφίνης.

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

Σε ένα πιάτο κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου microbatch plate VBATC-1/1-PHO-10 (Εικόνα 15) της εταιρείας Douglas Instrumets προστέθηκε παραφινέλαιο μέχρις ότου καλυφθούν τα πηγάδια. Η έγχυση του ελαίου έγινε στις γωνίες του τριβλίου και ήταν αργή προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων αέρα. Η αναλογία ανάμιξης πρωτεϊνικού διαλύματος : ρυθμιστικού διαλύματος BES (10 mM BES pH 6,7, 0,1 mM EDTA, 0,02% NaN₃) : διαλύματος πυρήνων(seeding) ήταν η εξής 2μl:2μl:1μl. Αρχικά, αναμίχθηκε η πρωτεΐνη με το ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη του διαλύματος πυρήνων με κομμένο tip και ακολούθησε μια γρήγορη ομογενοποίηση των διαλυμάτων. Τέλος, το μίγμα των τριών διαλυμάτων μεταφέρθηκε στο τριβλίο κρυσταλλώσεων.



Εικόνα 15: Τριβλίο Κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου microbatch plate VBATC-1/1-PHO-10 της εταιρείας Douglas Instrumets

3.2.6 Διερεύνηση συνθηκών κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας (Sitting drop)

Η μέθοδος της καθήμενης σταγόνας βασίζεται στη διάχυση ατμών από το διάλυμα εξισορρόπησης (reservoir) που περιέχει τον παράγοντα εξισορρόπησης σε μεγαλύτερο όγκο για την εξισορρόπηση της σταγόνας που περιέχει το πρωτεϊνικό διάλυμα και τον παράγοντα εξισορρόπησης.

Στην παρούσα εργασία έγινε σάρωση 191 συνθηκών κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας με τη χρήση robot κρυσταλλώσεων (OryxNano Douglas Instrumets). Οι συνθήκες αυτές προέρχονται από δύο εμπορικά kits. Το πρώτο εμπορικό kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Structure Screen I&II HT-96 της εταιρείας

Molecular Dimensions και το δεύτερο ήταν το JBScreen Basic 1,2,3,4 της εταιρίας Jena Bioscience. Από το kit της Jena Bioscience απουσίαζε η συνθήκη **F11**. Στο **Παράρτημα** φαίνονται αναλυτικά τα διαλύματα και των δύο εμπορικών kits.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου Swissci 'MRC' two drop plates SW2T-PS/1-10 (**Εικόνα 16**) της εταιρείας Douglas Instruments κατάλληλα για το robot κρυσταλλώσεων. Στη θέση των διαλυμάτων εξισορρόπησης (reservoir) προστέθηκε με χρήση πολυπιπέτας μικρός όγκος (50 μ l) από τα διαλύματα των kits. Εν συνεχεία, το τριβλίο κρυστάλλωσης τοποθετήθηκε στο robot και ρυθμίστηκε ο όγκος της σταγόνας που επρόκειτο να εγχυθεί στο κάθε βοθρίο. Ο συνολικός όγκος της σταγόνας ρυθμίστηκε στα 0,4 nl και αποτελείται από 60% πρωτεΐνη, 30% διάλυμα εξισορρόπησης και 10% seeding. Μετά την ολοκλήρωση έγχυσης των σταγόνων το τριβλίο καλύφθηκε με διαφανή ταινία η οποία μας επέτρεψε την μετέπειτα παρακολούθηση της πορείας της διαδικασίας κρυστάλλωσης. Το τριβλίο παρατηρήθηκε κάτω από στερεοσκόπιο και αποθηκεύτηκε. Από τα 191 διαλύματα που δοκιμάστηκαν αρχικά περιοριστήκαμε σε 3 τα δύο από τα οποία μελετήθηκαν εκτενέστερα.

Κατά το χρονικό διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων σε τριβλία κρυσταλλώσεων 24 θέσεων και πάλι με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας. Πειραματικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Σε τριβλίο 24 θέσεων τοποθετήθηκαν 700 μ l διαλύματος εξισορρόπησης στη θέση του reservoir. Έπειτα στο πηγάδι προστέθηκε το διάλυμα της πρωτεΐνης και τέλος ίσος όγκος μεταφέρθηκε από το διάλυμα εξισορρόπησης στην πρωτεΐνη και αναμίχθηκαν. Το τριβλίο καλύφθηκε με διαφανή ταινία και παρατηρήθηκε κάτω από στερεοσκόπιο πριν την αποθήκευση του.

Οι διαδικασίες κρυσταλλώσεων πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 20°C, ενώ η αποθήκευση και φύλαξη των τριβλίων έγινε σε θερμοκρασία 16 °C. Συνίσταται η τακτική παρακολούθηση των τριβλίων κάτω από το στερεοσκόπιο.



Εικόνα 16: τριβλίο κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου Swissci 'MRC' two drop plates SW2T-PS/1-10 Douglas Instruments κατάλληλα για το robot κρυσταλλώσεων OryxNano Douglas Instruments

3.2.7 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Στη διάρκεια την διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας έγινε προσπάθεια συλλογής δεδομένων από κρυστάλλους φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με τη χρήση συγχροτρονίου.

Οι προσπάθειες ανάκτησης των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκαν στη συμβατική πηγή ακτίνων-Χ (SuperNova X-ray Diffraction System, Rigaku Oxford Diffraction) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στην Αθήνα. Ως κρυσπροστατευτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα DMSO συγκέντρωσης 30% το οποίο αραιώθηκε σε διάλυμα της συνθήκης B5 (1 M οξικό νάτριο και 0,1 M ιμιδαζόλιο pH 6,5) από το kit **Structure Screen I&II** της εταιρείας **Molecular Dimension** (βλ. **Παράρτημα**) στο οποίο αναπτύχθηκε ο κρύσταλλος. Το διάλυμα της συνθήκης κατασκευάζεται πιο πυκνό ώστε μετά την προσθήκη του κρυσπροστατευτικού η συγκέντρωση της συνθήκης να εξισορροπηθεί με αυτή στο τριβλίο κρυσταλλώσεων.

Το κρυσπροστατευτικό προστέθηκε με πιπέτα στο διπλανό από τον εξεταζόμενο κρύσταλλο βοθρίο. Ακολούθησε η διαδικασία της συλλογής κρυστάλλου από το τριβλίο κρυσταλλώσεων με την βοήθεια μιας νάλιον θηλιάς. Εντοπίστηκε απομονωμένος κρύσταλλος, έγινε συλλογή του με τη βοήθεια της νάλιον θηλιάς και τοποθετήθηκε στο κρυσπροστατευτικό όπου και αφέθηκε για σύντομο χρονικό διάστημα για εξισορρόπηση. Έπειτα η θηλιά με τον κρύσταλλο μεταφέρθηκε στο γωνιόμετρο (crystal munding) της πηγής όπου έγινε η ακτινοβολήση του.

4 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Για να γίνει πιο εύκολη αντιστοίχιση των επιτυχημένων δοκιμών με τις εικόνες των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε αρίθμηση των τριβλίων κρυσταλλώσεων

4.1 Τριβλία κρυσταλλώσεων 24 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας

Τριβλία κρυσταλλώσεων 24 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας				
Αριθμός τριβλίου κρυστάλλωσης	Συγκέντρωση rmGPb (mg/ml)	DTT/IMP/Spermine	Seeding	Συνθήκες κρυστάλλωσης
01	(10,15,20,15) mg/ml	+	10^{-7}	Διάλυμα BES pH 6,7
02	25 mg/ml	+	10^{-6} - 10^{-8}	B5
			10^{-6}	C1
03	25 mg/ml	+	10^{-4} - 10^{-6}	B5
04	(5,10,15,20) mg/ml	+		A1,A2,B1,B2

Πίνακας 4: Συνθήκες κρυστάλλωσης rmGPb σε τριβλία 24 θέσεων

Για τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις (25 mg/ml και 31,6 mg/ml) της μυικής ισομορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μύες κουνελιών (rmGPb). Το διάλυμα του ενζύμου αραιώθηκε, στις επιθυμητές συγκεντρώσεις κάθε φορά, με τη χρήση διαλύματος BES (10 mM BES pH 6,7., 0,1 mM EDTA και 0,02% NaN_3) Η συνθήκη B5 (1 M οξικό νάτριο και 0,1 M ιμιδαζόλιο pH 6,5) και η συνθήκη C1(0,2 M ένυδρο θειικό νάτριο, 0,1 M νάτριο HEPES pH 7,5 και 20% v/v 2-προπανόλη). Οι δύο αυτές συνθήκες προέρχονται από το kit συνθηκών Structure Screen I&II Molecular Dimensions(Παράρτημα). Τέλος, το διάλυμα A1(0,1 M TRIS-HCl, 2,0 M θειικό αμμώνιο, pH 8,5) το διάλυμα A2(0,1 M TRIS-HCl, 0,2 M ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο, 30% w/v πολυαιθυλενογλυκόλη 4,000, pH 8,5) το διάλυμα B1(0,1 M TRIS-HCl pH 8,5 και 1,0 M θειικό αμμώνιο) και B2(0,1 M TRIS-HCl, 0.2 M ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο και 15% w/v πολυαιθυλενογλυκόλη 4,000 pH 8,5). Τα τέσσερα αυτό διαλύματα ανήκουν στο Pre-Crystallization Test της εταιρίας Hampton Research(Παράρτημα).

Οι παραπάνω δοκιμές κρυστάλλωσης με την τεχνική της καθήμενης σταγόνας έδωσαν τις εξής παρατηρήσεις:

- ✓ Στα τριβλία με τους αριθμούς (01), (02) και (03) δεν αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι. Όλη η πρωτεΐνη κατακρημνίστηκε.
- ✓ Τα αποτελέσματα του τριβλίου (04) συνοψίζονται στο ακόλουθο πίνακα και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η rmGPb μπορεί να κρυσταλλωθεί.

Pre-Crystallization Test				
Συγκέντρωση rmGPb (mg/ml)	A1	A2	B1	B2
5 mg/ml	l.p.	h.p.	l.p.	l.p.
10 mg/ml	l.p.	h.p.	l.p.	p.
15 mg/ml	h.p.	h.p.	l.p.	h.p.
20 mg/ml	h.p.	h.p.	l.p.	h.p.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια Pre-Crystallization Test

Με τις συντομογραφίες αναφέρονται στην περιεκτικότητα του ιζήματος

l.p. → ελαφρύ ίζημα (light precipitate)

p. → μεσαίας περιεκτικότητας ίζημα (precipitate)

h.p. → βαρύ ίζημα (heavy precipitate)

4.2 Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας για Robot OryxNano

Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας					
Αριθμός τριβλίου κρυστάλλωσης	Συγκέντρωση rmGPb (mg/ml)	DTT/IMP/Spermin	AMP	Seeding	Συνθήκες κρυστάλλωσης
05	25 mg/ml	+	-	10^{-7}	SS1-SS2
06	25 mg/ml	-	-	10^{-7}	SS1-SS2
07	25mg/ml	+/-	-	$10^{-4}-10^{-8}$	B5, C1
08	15mg/ml	+/-	-	$10^{-4}-10^{-8}$	B5, C1
09	25mg/ml	-	-	10^{-5}	JBScreening
10	(10,15,25)mg/ml	-	-	10^{-5}	B5
11	(5,10) mg/ml	-	-	$10^{-6}-10^{-7}$	B5
	25mg/ml	+	-	$10^{-4}-10^{-6}$	C1
	25 mg/ml	-	-	10^{-5}	F4
12	19,4 mg/ml (- Activated C)	-	+/-	10^{-5}	B5
	20 mg/ml				
13	20 mg/ml (+/- Activated C)	+	+/-	10^{-5}	B5
14	20 mg/ml (+/- Activated C)	-	+/-	$10^{-4}-10^{-6}$	B5
15	(20,25)mg/ml	-	-	$10^{-4}-10^{-6}$	B5
16	23,11 mg/ml	-	+	$10^{-4}-10^{-6}$	B5
17	18,67 mg/ml	-	-	$10^{-4}-10^{-6}$	B5

Πίνακας 6: Συνθήκες κρυστάλλωσης rmGPb σε τριβλία 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας

Ως Activated Charcoal στον πίνακα αναφέρεται ο ενεργός ζωάνθρακας.

Στις παραπάνω δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις gmGPb (18,7 mg/ml, 19,4 mg/ml, 22,65 mg/ml, 23,11 mg/ml, 25 mg/ml, 31,6 mg/ml, 40 mg/ml, 52,26 mg/ml, 73,1 mg/ml). Στα τριβλία με τους αριθμούς (05) (**Πίνακας 7**) και (06) (**Πίνακας 10**) έγινε η αρχική σάρωση και ως συνθήκες κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα του kit **Structure Screen I&II** της εταιρίας **Molecular Dimensions(SS1-SS2,MD)**. Τα διαλύματα του kit φαίνονται αναλυτικά στο **Παράρτημα**. Από την παρακολούθηση των τριβλίων παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων στις συνθήκες **B5** και **C1** και λόγω αυτού πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση των συνθηκών αυτών. Στο τριβλίο με τον αριθμό (09) (**Πίνακας 9**) διεξήχθει σάρωση νέων συνθηκών και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit **JBScreen Basic 1,2,3,4** της εταιρίας **Jena Bioscience**. Τα διαλύματα αναγράφονται αναλυτικά στο **Παράρτημα**. Από τη νέα σάρωση προέκυψε μία υποσχόμενη συνθήκη για ανάπτυξη κρυστάλλων η οποία όμως δεν ευδοκίμησε. Η συνθήκη αυτή ήταν η **F4** (1 M θειικό λίθιο, 100 mM Tris-HCl και 10 mM χλωριούχο νικέλιο (II) pH 8,5(**JBScreen Basic 1,2,3,4**) (**Παράρτημα**). Οι τρεις αυτές συνθήκες που προέκυψαν από τις δυο σαρώσεις εξετάστηκαν στο τριβλίο με το νούμερο (11). Στα τριβλία με τους αριθμούς (07) και (08) πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της ανάπτυξης κρυστάλλων στις συνθήκες **B5** και **C1 (SS1 - SS2, MD)** σε συνδιασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμάτων πυρήνων (seeding) και παρουσία ή απουσία 3 mM DTT, 1 mM IMP και 1 mM σπερμίνη. Το τριβλίο (08) δεν οδήγησε στην ανάπτυξη κρυστάλλων και παρέμεινε καθαρό για διάστημα περίπου δύο εβδομάδων. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα παρατηρήθηκε η εμφάνιση ελαφριού ιζήματος. Αντίθετα στο τριβλίο (07) (**Πίνακας 8**) αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι σε διάφορες συγκεντρώσεις διαλυμάτων πυρήνων καθώς και παρουσία ή απουσία DTT, IMP, Spermine. Ωστόσο περισσότερο καλοσηματισμένοι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν απουσία DTT, IMP, Spermin, παρόλο που και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν συσσωματώματα κρυστάλλων. Τα παραπάνω αποτελέσματα του τριβλίου (07) παρατηρήθηκαν με τη χρήση της συνθήκης B5. Η συνθήκη C1 έδωσε μόνο καθαρές σταγόνες χωρίς κάποια μεταβολή με την πάροδο του χρόνου. Στο τριβλίο (10) (**Πίνακας 10**) διερευνήθηκε η ανάπτυξη κρυστάλλων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου. Κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν για όλες τις συγκεντρώσεις του ενζύμου. Για συγκέντρωση gmGPb 25 mg/ml οι κρύσταλλοι φαίνονται στις **Εικόνες (17,18,19)**. Για συγκέντρωση gmGPb 15 mg/ml οι κρύσταλλοι φαίνονται στις **Εικόνες (20,21,22,23,24,25,26,27,28,29)**. Για συγκέντρωση gmGPb 15 mg/ml οι κρύσταλλοι φαίνονται στις **Εικόνες (30,31)**. Τα τριβλία των αριθμών (12), (14), (13) και (16) δημιουργήθηκαν με σκοπό την εξέταση της συμβολής του AMP μέσω του οποίου ευνοείται η R διαμόρφωση, στην ανάπτυξη κρυστάλλων ή στην αναστολή αυτής όταν ως συνθήκη κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη με τις περισσότερες επιτυχημένες δοκιμές (**B5**). Επίσης εξετάστηκε αν η συμβολή μεταβάλλεται όταν το AMP προστίθεται ως πρόσθετο στη συνθήκη κρυστάλλωσης. Για τους προαναφερθέντες λόγους συλλέχθηκε δείγμα πρωτεΐνης αμέσως μετά την απομάκρυνση της γλυκερόλης, στην οποία ήταν

αποθηκευμένη (δείγματα χωρίς ενεργό άνθρακα (Activated Charcoal)). Σε δείγματα που υπέστησαν κατεργασία με ενεργό άνθρακα(απαλλαγμένα από το AMP) και σε δείγματα χωρίς κατεργασία με ενεργό άνθρακα προστέθηκε μικρή ποσότητα 1mM AMP. Επίσης, τα παραπάνω εξετάστηκαν και συναρτήσεως της αραιώσεως του διαλύματος πυρήνων (τρυβλία (14) και (16)). Από τις συνολικές προσπάθειες εξέτασης της συμβολής του AMP αυτές που καρποφόρησαν ήταν στο τρυβλίο (14) (Πίνακας 7) και (16). Παρ'όλα ταύτα έδωσαν κρυστάλλους σε μορφή βελόνας, που δεν είναι επιθυμητοί για πειράματα συλλογής δεδομένων μέσω ακτίνων-Χ. Στα τρυβλία (12) και (13) δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή.

Επιπλέον προσπάθειες ανάκτησης κρυστάλλων με την συνθήκη B5 (τρυβλία (15), (17)) δεν είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται οι δοκιμές που οδήγησαν στην επιτυχημένη ανάπτυξη κρυστάλλων. Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος έγινε ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρακολούθηση την τριβλίων κρυσταλλώσεων κάτω από στερεοσκόπιο. Για διευκόλυνση έγινε αντιστοίχιση με αριθμούς (0-5) η ύπαρξη ή όχι ίζηματος ενώ με τις συντομογραφίες (Crys), (SCrys), (Junk) και (Σφαι) σημειώθηκαν τα βοθρία όπου υπήρχαν κρύσταλλοι, μικροκρύσταλλοι (small crystals), μη κρυσταλλικό ξένο σώμα (Junk) και σφαιρουλίτες αντίστοιχα.

- 0 → απουσία ιζήματος και κρυστάλλων, σφαιρουλίτες, μη κρυσταλλικό ξένο σώμα (Junk)
- 1-2 → ελαφρύ ίζημα
- 3 → μεσαίας περιεκτικότητας ίζημα
- 4-5 → βαρύ ίζημα
- Κρύσταλλοι (Crys), (SCrys)

(05) rmGPb (25mg/mL) + DTT/IMP/Spermine + seeding 10^{-7} SS1-SS2 Molecular Dimension											
Ημερομηνία παρακολούθησης 09/03/2017											
2	4	4	5	1	4	3	3	2	1	2	Crys
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	4	4	0	Crys	4	3	5	1	0	2	SCrys
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
SCry	Σφαι	1	1	1	4	1	2	1	1	2	2
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
2	2	1	0	2	1	4	2	2	4	2	0
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Σφαι	0	2	1	1	1	3	2	1	4	1	1
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0	4	1	5	1	2	Σφαι	2	2	3	1	1
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0	4	4	0	2	2	0	0	1	3	4	1
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0	1	2	2	2	2	0	Σφαι	0	5	1	0
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Πίνακας 7: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων rmGPb (25mg/mL) + DTT/IMP/Spermine + seeding 10^{-7} SS1-SS2

(07) rmGPb (25mg/mL) 15/03/2017 + (+/- DTT/IMP/Spermine) + seeding (10^{-4}-10^{-8}) B5,C1											
Ημερομηνία παρακολούθησης 17/03/2017											
10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
0	Crys	Crys	Crys	Crys		Crys	Crys	Crys	0	0	B5
A1	A2	A3	A4	A5		A7	A8	A9	A10	A11	
0	Crys	Crys	Crys	Crys		Crys	0	0	0	0	
B1	B2	B3	B4	B5		B7	B8	B9	B10	B11	
0	Crys	Crys	Crys	Crys		Crys	Crys	0	0	0	
C1	C2	C3	C4	C5		C7	C8	C9	C10	C11	
0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	C1
E1	E2	E3	E4	E5		E7	E8	E9	E10	E11	
0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
F1	F2	F3	F4	F5		F7	F8	F9	F10	F11	
0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
G1	G2	G3	G4	G5		G7	G8	G9	G10	G11	
+DTT/IMP/Spermine						-DTT/IMP/Spermine					

Πίνακας 8: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων rmGPb (25mg/mL) 15/03/2017 + (+/- DTT/IMP/Spermine) + seeding (10^{-4} - 10^{-8}) B5,C1

(09) rmGPb (25mg/mL) 20/03/2017 + seeding 10⁻⁵ JBScreening											
Ημερομηνία παρακολούθησης 21/03/2017											
Σφαι	0	0	2	1	3	4	3	3	2	3	1
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0	0	1	1	4	4	4	2	5	3	3	2
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
Cry?	Σφαι	0	3	5	3	4	4	3	4	4	1
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	1	0	5	5	4	0	3	3	3	4	2
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Σφαι	0	0	0	0	3	3	2	2	1	0	0
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
Θολο	Θολο	0	Crys	3	1	3	3	1	1		0
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0	0	0	0	3	2	4	3	3	4	0	3
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0	0	0	Σφαι	2	2	2	4	4	5	1	1
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Πίνακας 9: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων rmGPb (25mg/mL) 20/03/2017 + seeding 10⁻⁵ JBScreening

(06) rmGPb (25mg/mL) 08/03/2017 + seeding 10⁻⁷ SS1-SS2 Molecular Dimension											
Ημερομηνία παρακολούθησης 23/03/2017											
5	5	5	5	5	5	4	3	5	4	4	0
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0	4	4	3	Crys	4	4	5	4	4	4	1
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0	0	3	4	3	5	5	4	5	2	5	2
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	0	5	3	4	5	5	3	4	5	5	1
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0	0	5	5	1	1	4	3	4	4	2	4
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0	Σφαι	5	4	2	1	5	0	4	5	0	4
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0	1	5	5	4	3	4	4	3	3	5	5
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0	0	5	5	4	4	3	5	3	5	4	2
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Πίνακας 10: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων rmGPb (25mg/mL) 08/03/2017 + seeding 10⁻⁷ SS1-SS2 Molecular Dimension

(10) rmGPb (10,15,25mg/mL) 30/03/2017 + seeding 10⁻⁵ B5												
Ημερομηνία παρακολούθησης 03/04/2017												
0	0	0	Crys	Crys	0	0	0	0	0	0	0	25mg/ml
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
0	0	Crys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15mg/ml
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	
0	0	Crys	Crys	Crys	0	Crys	Crys	0	0	Crys	0	10mg/ml
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	
0	0	0	Crys	0	0	0	Crys	Crys	0	Crys	Crys	10mg/ml
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	
0	0	0	Crys	0	0	0	0	0	0	0	Crys	10mg/ml
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	
0	0	0	2	Crys	Crys	3	Crys	3	0	Crys	Crys	10mg/ml
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	

Πίνακας 11: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων rmGPb (10,15,25mg/mL) 30/03/2017 + seeding 10⁻⁵ B5

(14) rmGPb (20mg/mL) + (+/- AMP, ζωC) + seeding (10⁻⁴ – 10⁻⁶)B5													
Ημερομηνία παρακολούθησης 11/05/2017													
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ⁻⁵	-ζωC
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12		
0	Crys	Crys	Crys	0	0	Crys	Crys	0	0	Crys	0	10 ⁻⁵	+ζωC
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ⁻⁵	+ζωC
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ⁻⁴	+ζωC
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ⁻⁵	+ζωC
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ⁻⁶	+ζωC
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12		

Πίνακας 12: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων rmGPb (20mg/mL) + (+/- AMP, ζωC) + seeding (10⁻⁴ – 10⁻⁶)B5

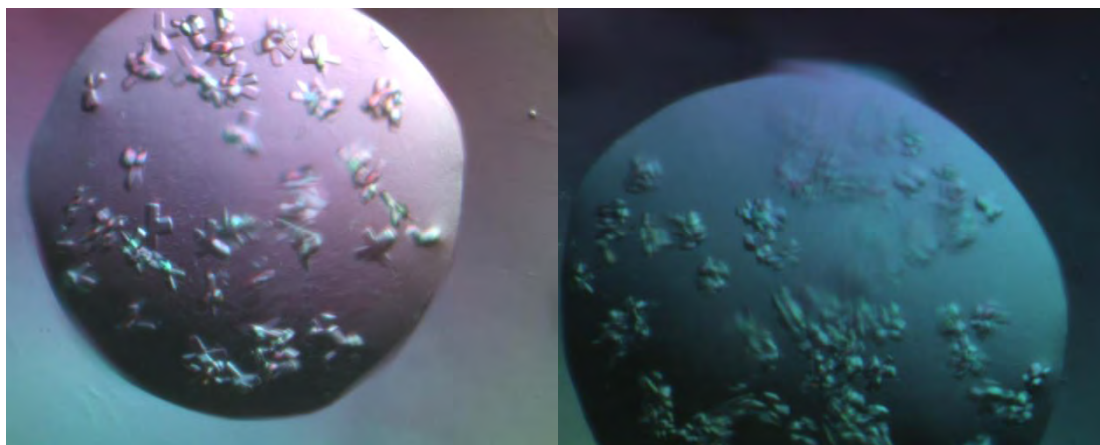
Τα τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου καθημερινής σταγόνας με τους αριθμούς (10) και (16) στα οποία παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων

μεταφέρθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τη λήψη κρυσταλλογραφικών δεδομένων από πηγές ακτίνων-Χ και φωτογραφιών.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι φωτογραφίες κρυστάλλων φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

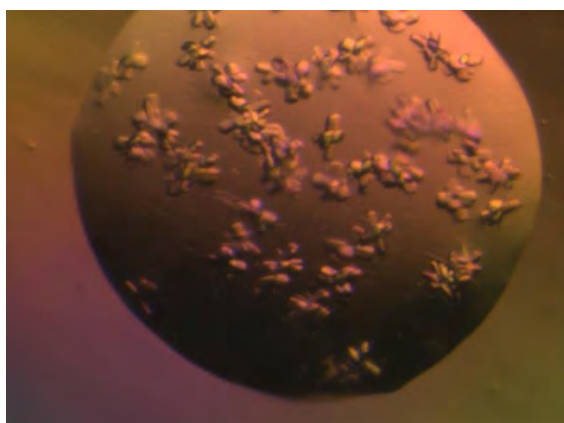
Τριβλίο κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας νούμερα (10)

- Συνθήκη κρυστάλλωσης: rmGPb (25 mg/ml), συνθήκη κρυστάλλωσης η συνθήκη B5(1 M οξικό νάτριο, 0,1 M ιμιδαζόλιο, pH 6,5 SS1&2, MD) και διάλυμα πυρήνων 10^{-5} . Οι σταγόνες των συνθηκών αυτών τοποθετήθηκαν στα βοθρία A1-A12 και B1-B12 του τριβλίου



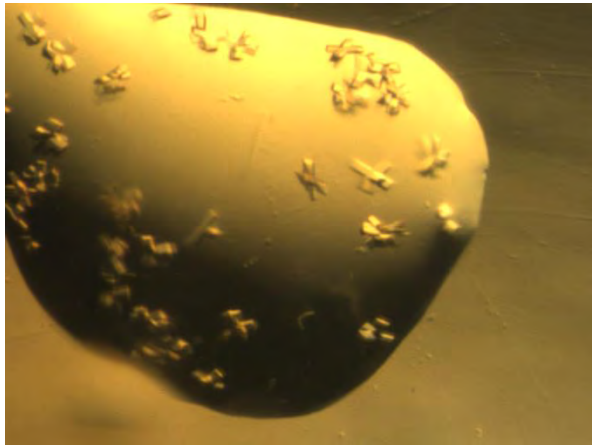
Εικόνα 17: Βοθρίο A4

Εικόνα 18: Βοθρίο A5

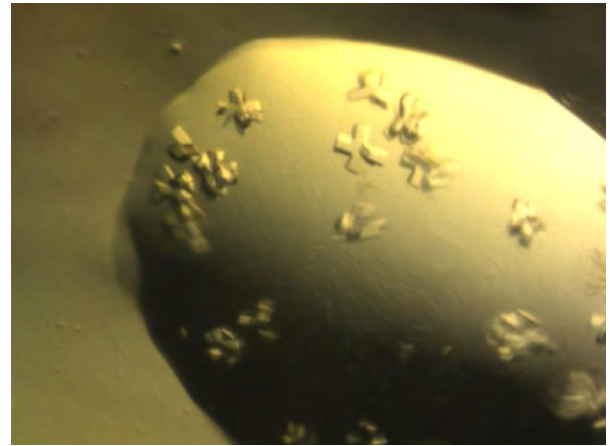


Εικόνα 19: Βοθρίο B3

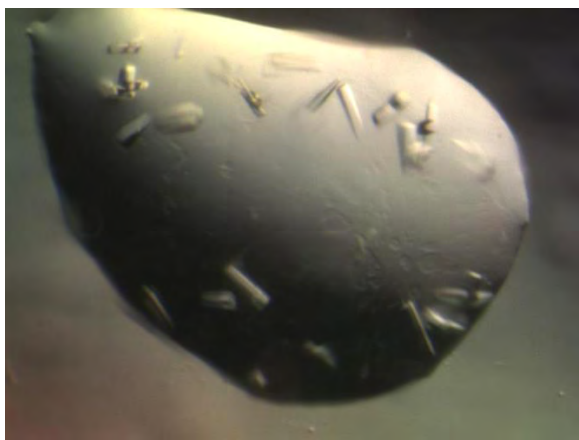
- Συνθήκη κρυστάλλωσης: rmGPb (15 mg/ml), συνθήκη κρυστάλλωσης η συνθήκη B5(1 M οξικό νάτριο, 0,1 M ιμιδαζόλιο, pH 6,5 SS1&2, MD) που περιέχει 1 M Sodium Acetate, 0,1 M Imidazole με pH 6,5 και διάλυμα πυρήνων 10^{-5} . Οι σταγόνες των συνθηκών αυτών τοποθετήθηκαν στα βοθρία D1-D12 και E1-E12 του τριβλίου.



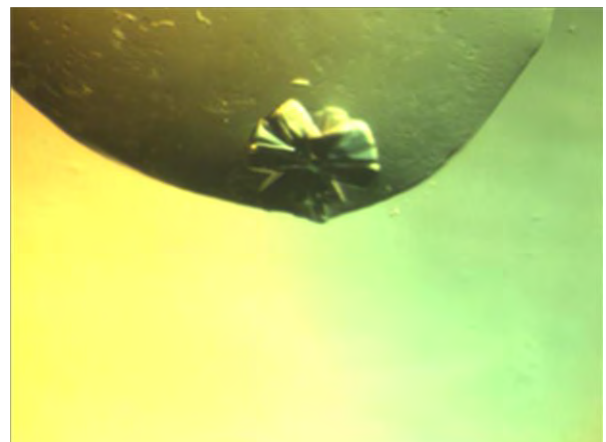
Εικόνα 20: Βοθρίο D3



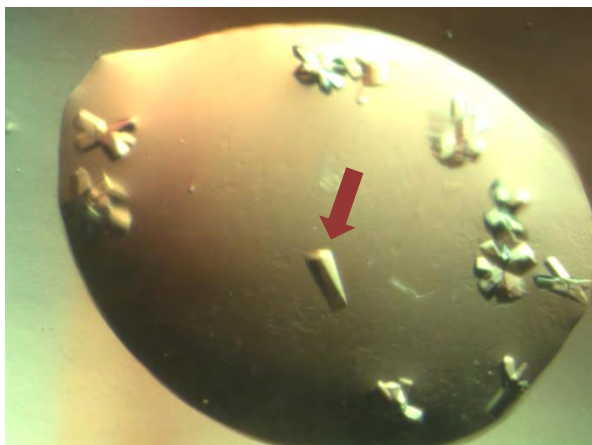
Εικόνα 21: Βοθρίο D4



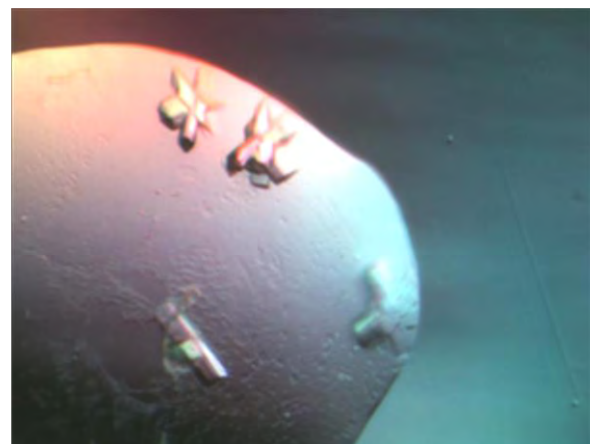
Εικόνα 22: Βοθρίο D5



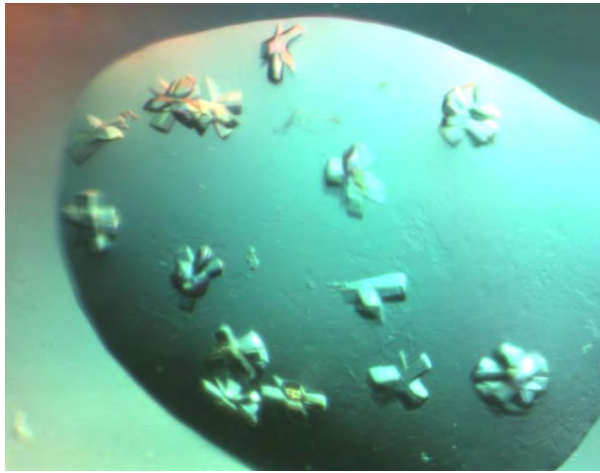
Εικόνα 23: Βοθρίο D7



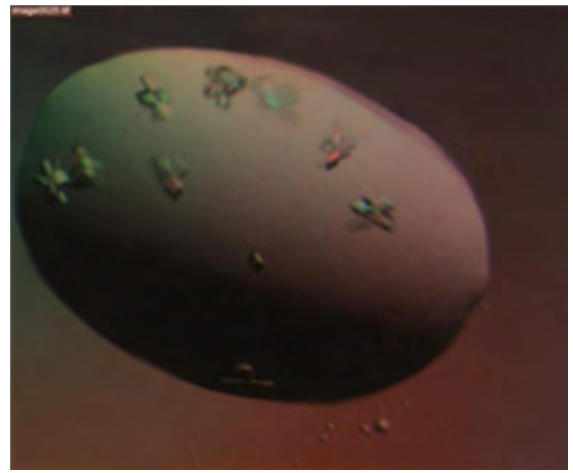
Εικόνα 24: Βοθρίο D8 με το βέλος υποδεικνύεται μονοκρύσταλλος



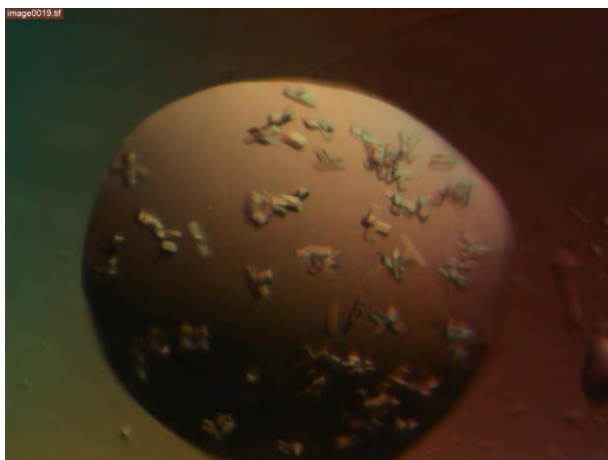
Εικόνα 25: Βοθρίο D10



Εικόνα 26: Βοθρίο D11



Εικόνα 27: Βοθρίο E8

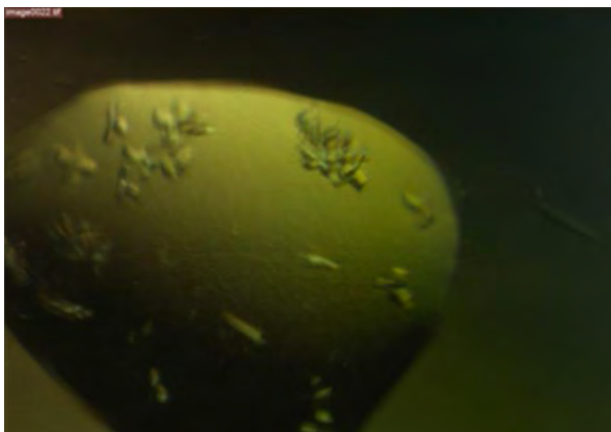


Εικόνα 28: Βοθρίο E9

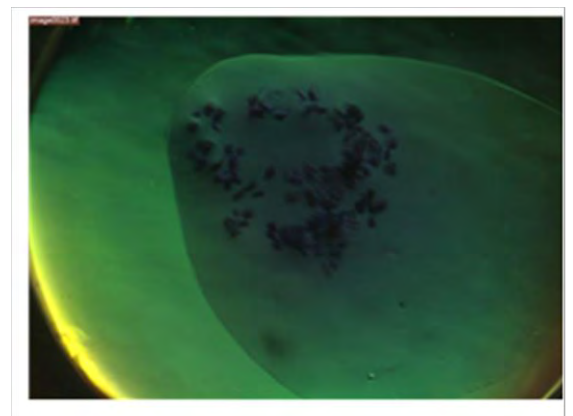


Εικόνα 29: Βοθρίο E11

- Συνθήκη κρυστάλλωσης: rmGPb (10 mg/ml), συνθήκη κρυστάλλωσης η συνθήκη B5(1 M οξικό νάτριο, 0,1 M μιδαζόλιο, pH 6,5 SS1&2, MD) και διάλυμα πυρήνων 10^{-5} . Οι σταγόνες των συνθηκών αυτών τοποθετήθηκαν στα βοθρία G1-G12 και H1-H12 του τριβλίου.



Εικόνα 30: Βοθρίο G4



Εικόνα 31: Βοθρίο H11 στο οποίο έχει προστεθεί 1 μl Μπλε του μεθυλενίου

4.3 Τριβλία κρυσταλλώσεων τύπου microbatch με τη χρήση ελαίου παραφίνης.

Στο πίνακα παρατίθενται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συγκεντρώσεις τους. Οι δοκιμές έγιναν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (20 mg/ml, 31,6 mg/ml, 40 mg/ml).

Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου microbatch								
Αριθμός τριβλίου κρυστάλλωσης	Συνθήκες κρυστάλλωσης							
	[rmGPb]	Όγκος rmGPb	DTT (200mM)	IMP (100mM)	Spermine 91,3 mM	AMP	BES pH6,7	Seeding
18	25 mg/ml	11,9 μl	0,23 μl	0,15 μl	0,16 μl	-	2,56 μl	10 ⁻⁵
	15 mg/ml	7,12 μl	0,23 μl	0,15 μl	0,16 μl	-	7,34 μl	10 ⁻⁵
19	15 mg/ml	14,24 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	14,68μl	10 ⁻⁵
	15mg/ml	14,24μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	14,68μl	10 ⁻⁵
	10 mg/ml	9,5 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	19,42μl	10 ⁻⁵
20α	25 mg/ml	23,73μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	5,19μl	10 ⁻⁵
	15 mg/ml	14,24 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	14,68μl	10 ⁻⁵
	10 mg/ml	9,5 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	19,42μl	10 ⁻⁵
20β	25 mg/ml	23,73 μl	-	-	-	-	6,27 μl	10 ⁻⁵
	10 mg/ml	14,24 μl	-	-	-	-	15,76μl	10 ⁻⁵
21α	25 mg/ml	18,75 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	10,17μl	10 ⁻⁵
	15 mg/ml	11,25 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	17,67μl	10 ⁻⁵
21β	10 mg/ml	7,5 μl	0,45μl	0,3μl	0,66μl	-	21,09μl	10 ⁻⁴
22α	20 mg/ml	15 μl	0,45μl	0,3μl	0,33μl	-	13,92μl	10 ⁻⁵
22β	20 mg/ml	19,08 μl	0,3 μl	0,2 μl	0,22 μl	0,1 μl	-	10 ⁻⁵

Πίνακας 13: Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων rmGPb με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων

Στην δοκιμή με τον αριθμό (18) τοποθετήθηκαν στο τριβλίο κρυσταλλώσεων από πέντε σταγόνες για κάθε συγκέντρωση rmGPb. Στην δοκιμή (22β) τοποθετήθηκαν 6 σταγόνες, ενώ για όλες τις υπόλοιπες τοποθετήθηκαν από 12 σταγόνες για κάθε συγκέντρωση.

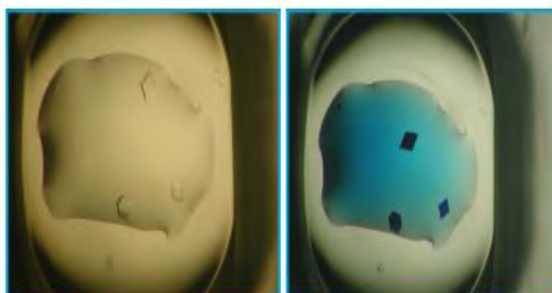
- Στη συγκεκριμένη δοκιμή(21β) η τελική συγκέντρωση του AMP ήταν 2 mM
- Στη συγκεκριμένη δοκιμή(20β) ως διάλυμα εξισορρόπησης χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη B5 από το kit **Structure Screen I&II** της εταιρίας **Molecular Dimension** (βλ. Παράρτημα)

Στο τριβλίο με τον αριθμό (18) αναπτύχθηκαν δύο κρύσταλλοι για τη συγκέντρωση πρωτεΐνης 25 mg/ml και ένας κρυστάλλος για τη συγκέντρωση 15 mg/ml.

Στα τριβλία (19), (21) και (22) δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων ή ιζήματος. Οι σταγόνες παρέμειναν καθαρές μέχρι το πέρας της διαδικασίας παρακολούθησης και καταγραφής αποτελεσμάτων. Αντίθετα στο τριβλίο με τον αριθμό (20) παρατηρήθηκε η δημιουργία ιζήματος.

Παρά το γεγονός ότι οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν με την τεχνική microbatch ήταν οι πιο καλοσχηματισμένοι δεν επιτεύχθηκε συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων μέσω ακτίνων-Χ καθώς μεσολάβησε μεγάλο χρονικό διάστημα από την ανάπτυξη τους μέχρι την δυνατότητα πρόσβασης σε πηγή ακτίνων-Χ. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να παρατηρηθεί εξάτμιση και συρρίκνωση των κρυστάλλων που τους κατέστησε ακατάλληλους για συλλογή δεδομένων.

Λόγω των αλάτων που προστίθενται στα διαλύματα κρυστάλλωσης είναι δυνατόν να επιτευχθεί ανάπτυξη κρυστάλλων άλατος. Οι κρύσταλλοι άλατος παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστικά που τους διαφοροποιούν από τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα περίθλασης ακτίνων-Χ, επίσης είναι ανθεκτικοί στο crush test αντίθετα οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης είναι εύθραυστοι. Μια άλλη τεχνική αναγνώρισης και διαχωρισμού ενός κρυστάλλου άλατος από έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο είναι η προσπάθεια χρώσης με τη μέθοδο IZIT Dye. Όταν μικρή ποσότητα της χρωστικής Μπλε του Μεθυλενίου (Methylene Blue) προστεθεί στη σταγόνα απορροφάται από τους κρυστάλλους πρωτεΐνης προσδίδοντας τους ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα (**Εικόνα 32**). Η ικανότητα των πρωτεϊνικών κρυστάλλων να προσλαμβάνουν τη χρωστική οφείλεται στην ύπαρξη μεγάλων διαλυτών καναλιών στη δομή τους. Η απουσία των καναλιών σε κρυστάλλους άλατος και μικρών μορίων τους καθιστά ανίκανους να απορροφούν την χρωστική και επομένως παραμένουν άχρωμοι. [28]

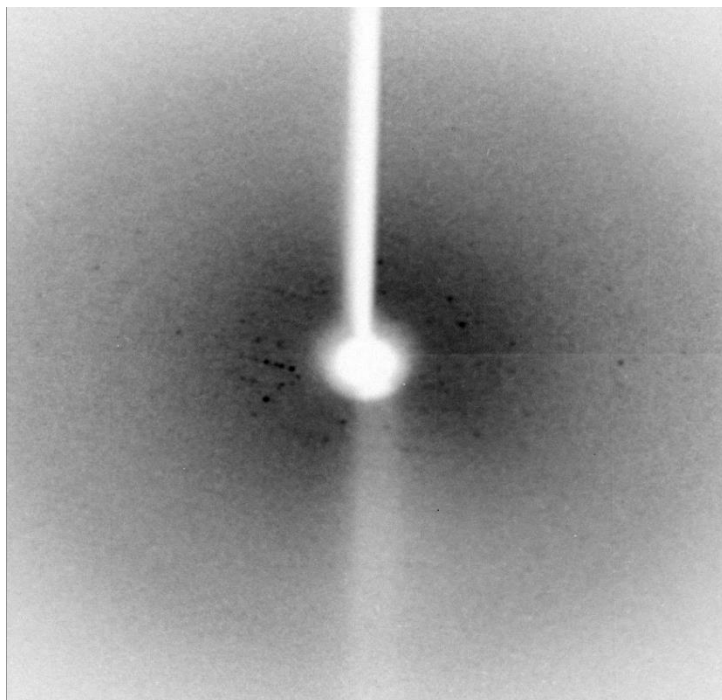


Εικόνα 32: Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι πριν(αριστερά) και μετά(δεξιά) τη χρώση με Μπλε του Μεθυλενίου [28]

Προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα των κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν στις διάφορες συνθήκες κρυστάλλωσης που διερευνήθηκαν κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες χρώσης αυτών. Αυτό αποτέλεσε ένα πρώτο βήμα διαλογής των κρυστάλλων που χρησιμοποιήθηκαν για

συλλογή δεδομένων περίθλασης μέσω ακτινοβολίας ακτίνων-Χ. Πρακτικά προστέθηκε 1 μl Μπλέ του Μεθυλενίου σε αραιώση $\frac{1}{10}$ σε επιλεγμένες συνθήκες των τριβλίων 96 θέσεων τύπου καθήμενης σταγόνας. Η χρωστική απορροφήθηκε απευθείας υποδεικνύοντας την ύπαρξη κρυστάλλων πρωτεΐνης.

Σε επόμενο στάδιο και μετά την επιβεβαίωση της ύπαρξης πρωτεϊνικών κρυστάλλων έγινε μεταφορά δύο τριβλίων κρυστάλλωσης 96 θέσεων στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών για την προσπάθεια ακτινοβολίας τους και τη συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν ασθενή (Εικόνα 33) παρόλα αυτά επιβεβαίωσαν το γεγονός ότι οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν ήταν κρύσταλλοι πρωτεΐνης.



Εικόνα 33: Διάγραμμα περίθλασης συμβατικής πηγής ακτίνων-Χ της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Το παραπάνω περιθλασίγραμμα προέκυψε από την ακτινοβολήση κρυστάλλου που αναπτύχθηκε στην ακόλουθη συνθήκη: gmGPb(15 mg/ml) ως συνθήκη κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη B5 (1 M οξικό νάτριο, 0,1 M ιμιδαζόλιο pH 6,5) (SS1&2, MD) που περιέχει καθώς και διάλυμα πυρήνων συγκέντρωσης 10^{-5} .

- ❖ Συνοψίζοντας, κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά σάρωση 191 συνθηκών κρυστάλλωσης από τις οποίες επιλέχθηκαν τρεις για περαιτέρω διερεύνηση. Οι τρεις αυτές συνθήκες ήταν η συνθήκη **B5** (1 M οξικό νάτριο και 0,1 M ιμιδαζόλιο, pH 6,5), η συνθήκη **C1** (0,2 M ένυδρο θειικό νάτριο, 0,1 M νάτριο HEPES pH 7,5 και 20% v/v 2-Προπανόλη,) από το kit **Structure Screen I&II** της εταιρίας **Molecular Dimensions** και η συνθήκη **F4** (1 M θειικό λιθίου, 100 mM Tris-HCl pH 8,5 και 10 mM χλωριούχο -νικέλιο (II)), από το kit **JBScreen Basic 1,2,3,4** της εταιρίας **Jena Bioscience**. Η συνθήκη με τις περισσότερες επιτυχημένες δοκιμές ήταν η **B5** και λόγω αυτού επιλέχθηκε ως

συνθήκη κρυστάλλωσης για την επιμέρους διερεύνηση συνθηκών κρυστάλλωσης. Σε δεύτερο επίπεδο διερευνήθηκε η συμβολή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στην κρυστάλλωση. Παρατηρήθηκε ότι χαμηλές συγκεντρώσεις rmgPb μικρότερες των 10mg/ml δεν ευνοούν την ανάπτυξη κρυστάλλων ενώ σχετικά καλοσηματισμένοι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων rmgPb (10-25) mg/ml. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η συμβολή των πυρήνων στην κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση πυρήνων (seeding) συγκέντρωσης 10^4 - 10^8 παρουσία και απουσία 3 mM DTT, 1 mM IMP και 1 mM Spermine. Κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε όλες τις αραιώσεις του seeding παρουσία DTT, IMP, Spermin ενώ απουσία αυτών ανάπτυχθηκαν κρύσταλλοι για τις αραιώσεις του seeding 10^4 - 10^6 . Οι πιο καλοσηματισμένοι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν απουσία DTT, IMP, Spermin. Τέλος ερευνήθηκε η συσχέτιση της μορφολογίας των κρυστάλλων με την προσθήκη 1 mM AMP στις συνθήκες κρυστάλλωσης. Παρατηρήσαμε ανάπτυξη κρυστάλλων με μορφή βελόνων οι οποίοι δεν είναι επιθυμητοί για δομικές μελέτες λόγω του μικρού μεγέθους τους.

- ❖ Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν μέσω της συμβατικής πηγής ακτίνων-X στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών ήταν ασθενή και δεν επέτρεψαν τον χαρακτηρισμό του κρυστάλλου. Για αυτό το λόγο θα επιδιωχθεί η συλλογή δεδομένων σε ισχυρές συγχροτρονικές πηγές ακτίνων-X.

5 Βιβλιογραφία

1. Blundell, T., Jhoti, H., Abell, C., High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews*, January 2002
2. Γλυκός, Ν. Μ., Μια μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών (*ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ, Αθήνα, 2015*).
3. Petsko, G.A., Ringe, D. Primers in Biology. Protein Structure and Function. *New Science Press Ltd, 2004*
4. Krauss, R. I., Merlino, A., Vergara A., Sica F., An Overview of Biological Macromolecule Crystallization, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, **14**, **11643-11691**
5. McPherson, A., Introduction to protein crystallization *Second Edition*, (2009).
6. McPherson, A.; Nguyen, C.; Cudney, R.; Larson, S.B. The role of small molecule additives and chemical modification in protein crystallization. *Cryst. Growth Des.* 2011, **11**, **1469–1474**.
7. Holde van E. K., Curtis W. J., Shing P. H., Βιοφυσική, *Εκδόσεις Έμβρυο*, **6**, **343-345**
8. Doublet, Sylvie (Ed.) Macromolecular Crystallography Protocols Volume 1, Preparation and Crystallization of Macromolecules, *Human Press*,
9. Bergfors, T. Seeds to crystals. *J. Struct. Biol.* **142**, **66-76** (2003)
10. Lufta J.R., Wolfleya J. R., Snella E. H., What's in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments, *NIH Public Access Author Manuscript*, March 2011
11. University of Uppsala, www.xray.bmc.uu.se
12. Rhodes, G. Crystallography Made Crystal Clear. (*Academic Press, 1999*)
13. Carl Branden & John Tooze, Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών, *Δεύτερη έκδοση, Garland Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*
14. Καντσάδη Α., Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως μοριακός στόχος σχεδιασμού νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2015*
15. Kyriakis, E., Stravodimos, G. A., Kantsadi, A. L., Chatzileontiadiou, D. S.M., Skamnaki, V. T., Leonidas, D. D., Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b, *FEBS Letters*, May 2015
16. Agius, L (2015), Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism, *Molecular Aspects of Medicine* **46** **34–45**
17. Hayes, J. M., Kantsadi, A. L., Leonidas, D. D., Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes, *Phytochem Rev* **13**:**471–498**, (2014)

18. Jones, R. M., Thurston, D. E., Rotella, D., Guccione, S., Martinez, A., New Therapeutic Strategies for Type 2 Diabetes: Small Molecule Approaches, *Royal Society of Chemistry*, 2012
19. Browner, M. F., Fletterick, R. J., Phosphorylase: a biological transducer, *TIBS* 17- February 1992
20. Kantsadi, A. L., Apostolou, A., Theofanous, S., Stravodimos, G. A., Kyriakis, E., Gorgogietas, V. A., Chatzileontiadou, D. S.M., Pegiou, K., Skamnaki, V. T., Stagos, D., Kouretas, D., Psarra, A.-M. G., Haroutounian, S. A., Leonidas, D. D., Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase, *Food and Chemical Toxicology* 67 (2014) **35–43**
21. Treadway, J. L., Mendys, P., Hoover, D. J., Glycogen phosphotrylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus, *Ashley Publications Ltd. ISSN 1354-3784*
22. Witters, L. A., Avruch J., Insulin Regulation of Hepatic Glycogen Synthase and Phosphorylase, *Biochemistry* (1978)
23. Skamnaki, V. T., Kantsadi, A. L., Chatzileontiadou, D. S. M., Stravodimos, G., and Leonidas, D. D. (2013) Glycogen metabolism enzymes as molecular targets for drug development, In *Glycogen Structure, Functions in the body and role in disease* (Weiss, P. L., and Faulkner, B. D., Eds.), **pp 109-135**, Nova Science Publishers, Inc., New York.
24. Favaro, E., Bensaad, K., Chong, M. G., Tennant, D. A., Ferguson, D. J., Snell, C., Steers, G., Turley, H., Li, J. L., Gunther, U. L., Buffa, F. M., McIntyre, A., and Harris, A. L. (2012) Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells, *Cell Metab*16, **751-764**.
25. Blundell, T. L. and L. N. Johnson (1976). Protein Crystallography. London, Academic Press. Bokor, E., T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2010). "Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18(3): 1171-1180**
26. Oikonomakos, N. G., A. E. Melpidou and L. N. Johnson (1985). "Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalytic characterization." *Biochim Biophys Acta* **832(3): 248-256**.
27. Oikonomakos, N. G., K. R. Acharya, D. I. Stuart, A. E. Melpidou, P. J. McLaughlin and L. N. Johnson (1988). "Uridine(5')diphospho(1)-alpha-D-glucose. A binding study to glycogen phosphorylase b in the crystal." *Eur J Biochem* **173(3): 569-578**.
28. Izt crystal dye, User Guide , *Hampton Research Solution for Crystal Growth*, **HR4-710(pg1)**

V.Παράρτημα

Molecular Dimension Structure Screen I&II

Well#	Salt	Buffer	pH	Precipitant 1	Precipitant 2
A1	0,02 M Calcium chloride dehydrate	0,1 M Sodium acetate	4,6	30% v/v MPD	
A2	0,2 M Ammonium acetate	0,1 M Sodium acetate	4,6	30% w/v PEG 4000	
A3	0,2 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium acetate	4,6	25% w/v PEG 4000	
A4	2 M Sodium formate	0,1 M Sodium acetate	4,6		
A5	2 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium acetate	4,6		
A6		0,1 M Sodium acetate	4,6	8% w/v PEG 4000	
A7	0,2 M Ammonium acetate	0,1 M Sodium citrate	5,6	30% w/v PEG 4000	
A8	0,2 M Ammonium acetate	0,1 M Sodium citrate	5,6	30% v/v MPD	
A9		0,1 M Sodium citrate	5,6	20% w/v PEG 4000	20% v/v 2-Propanol
A10	1 M Ammonium phosphate monobasic	0,1 M Sodium citrate	5,6		
A11	0,2 M Calcium chloride dehydrate	0,1 M Sodium acetate	4,6	20% v/v 2-Propanol	
A12	1,4 M Sodium acetate trihydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5		
B1	0,2 M Sodium citrate dehydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	30% v/v 2-Propanol	
B2	0,2 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	30% w/v PEG 8000	
B3	0,2 M Magnesium acetate tetrahydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	20% w/v PEG 8000	
B4	0,2 M Magnesium acetate tetrahydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	30% v/v MPD	
B5	1 M Sodium acetate trihydrate	0,1 M Imidazole	6,5		
B6	0,2 M Sodium acetate trihydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	30% w/v PEG 8000	
B7	0,2 M Zinc acetate dihydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	18% w/v PEG 8000	
B8	0,2 M Calcium acetate hydrate	0,1 M Sodium cacodylate	6,5	18% w/v PEG 8000	
B9	0,2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	30% v/v MPD	
B10	0,2 M Magnesium chloride hexahydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	30% v/v 2-Propanol	
B11	0,2 M Calcium chloride dihydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	28% v/v PEG 400	
B12	0,2 M Magnesium chloride hexahydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	30% v/v PEG 400	
C1	0,2 M Sodium citrate trisbasic dihydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	20% v/v 2-Propanol	
C2	0,8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
C3	1,5 M Lithium sulfate	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
C4	0,8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate/ 0,8 M Potassium phosphate monobasic	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
C5	1,4 M Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
C6	2 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	2% v/v PEG 400	
C7		0,1 M Sodium HEPES	7,5	20% w/v PEG 400	10% v/v 2-Propanol
C8	2 M Ammonium sulfate	0,1 M Tris	8,5		
C9	0,2 M Magnesium chloride hexahydrate	0,1 M Tris	8,5	30% w/v PEG 4000	
C10	0,2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1 M Tris	8,5	30% v/v PEG 400	
C11	0,2 M Lithium sulfate	0,1 M Tris	8,5	30% w/v PEG 4000	
C12	0,2 M Ammonium acetate	0,1 M Tris	8,5	30% v/v 2-Propanol	
D1	0,2 M Sodium acetate trihydrate	0,1 M Tris	8,5	30% w/v PEG 4000	
D2		0,1 M Tris	8,5	8% w/v PEG 8000	
D3	2 M Ammonium phosphate monobasic	0,1 M Tris	8,5		
D4	0,4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate				
D5	0,4 M Ammonium phosphate monobasic				
D6	0,2 M Ammonium sulfate			30% w/v PEG 8000	
D7	0,2 M Ammonium sulfate			30% w/v PEG 4000	
D8	2 M Ammonium sulfate				
D9	4 M Sodium formate				
D10	0,05 M Potassium phosphate monobasic			20% w/v PEG 8000	
D11				30% w/v PEG 1500	
D12	0,2 M Magnesium formate dihydrate				

Molecular Dimension Structure Screen I&II

Well#	Salt	Buffer	pH	Precipitant 1	Precipitant 2
E1	0,1 M Sodium	0,1 M BICINE	9	30% v/v PEG 500 MME	
E2	2 M Magnesium chloride hexahydrate	0,1 M BINICE	9		
E3		0,1 M BINICE	9	10% w/v PEG 20000	2% v/v 1,4-Dioxane
E4	0,2 M Magnesium chloride hexahydrate	0,1 M Tris	8,5	3,4 M 1,6-Hexanediol	
E5		0,1 M Tris	8,5	25% v/v tert-Butanol	
E6	1 M Lithium sulfate/ 0,01 M Nickel(II) chloride hexahydrate	0,1 M Tris	8,5		
E7	1,5 M Ammonium sulfate	0,1 M Tris	8,5	12% v/v Glycerol	
E8	0,2 M Ammonium phosphate monobasic	0,1 M Tris	8,5	50% v/v MPD	
E9		0,1 M Tris	8,5	20% v/v Ethanol	
E10	0,01 M Nickel(II) chloride hexahydrate	0,1 M Tris	8,5	20% w/v PEG 2000 MME	
E11	0,5 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium HEPES	7,5	30% v/v MPD	
E12		0,1 M Sodium HEPES	7,5	10% w/v PEG 6000	5% v/v MPD
F1		0,1 M Sodium HEPES	7,5	20% v/v Jeffamine M-600	
F2	1,6 M Ammonium sulfate/ 0,1 M Sodium chloride	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
F3	2 M Ammonium formate	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
F4	1 M Sodium acetate trihydrate 0,05 M Cadmium sulfate $\frac{8}{3}$ hydrate	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
F5		0,1 M Sodium HEPES	7,5	70% v/v MPD	
F6	4,3 M Sodium chloride	0,1 M Sodium HEPES	7,5		
F7		0,1 M Sodium HEPES	7,5	10% w/v PEG 8000	8% v/v Ethylene glycol
F8	1,6 M Magnesium sulfate heptahydrate	0,1 M MES	6,5		
F9	2 M Sodium chloride/0,1 M Potassium phosphate monobasic/0,1 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	0,1 M MES	6,5		
F10		0,1 M MES	6,5	12% w/v PEG 20000	
F11	1,6 M Ammonium sulfate	0,1 M MES	6,5	10% v/v 1,4-Dioxane	
F12	0,05 M Cesium chloride	0,1 M MES	6,5	30% v/v Jeffamine M-600	
G1	0,01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 1,8 M Ammonium sulfate	0,1 M MES	6,5		
G2	0,2 M Ammonium sulfate	0,1 M MES	6,5	30% w/v PEG 5000 MME	
G3	0,01 M Zinc sulfate heptahydrate	0,01 M MES	6,5	25% v/v PEG 500 MME	
G4		0,1 M Sodium HEPES	7,5	20% w/v PEG 10000	
G5	2 M Ammonium sulfate 0,2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1 M Sodium citrate	5,6		
G6	1 M Lithium sulfate, 0,5 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium citrate	5,6		
G7	0,5 M Sodium chloride	0,1 M Sodium citrate	5,6	4% v/v Polyethyleneimine	
G8		0,1 M Sodium citrate	5,6	35% v/v tert-Butanol	
G9	0,01 M Iron(III) chloride hexahydrate	0,1 M Sodium citrate	5,6	10% v/v Jeffamine M-600	
G10	0,01 M Manganese(II) chloride tetrahydrate	0,1 M Sodium citrate	5,6	2,5 M 1,6-Hexanediol	
G11	2 M Sodium chloride	0,1 M Sodium acetate	4,6		
G12	0,2 M Sodium chloride	0,1 M Sodium acetate	4,6	30% v/v MPD	
H1	0,01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1 M Sodium acetate	4,6	1 M 1,6-Hexanediol	
H2	0,1 M Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0,1 M Sodium acetate	4,6	30% v/v PEG 400	
H3	0,2 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium acetate	4,6	30% w/v PEG 2000 MME	
H4	2 M Sodium chloride			10% w/v PEG 6000	
H5	0,05 M Sodium chloride/ 0,1 M Magnesium chloride hexahydrate/0,01 M CTAB				
H6				25% v/v Ethylene glycol	
H7				35% v/v 1,4-Dioxane	
H8	2 M Ammonium sulfate			5% v/v 2-Propanol	
H9		1 M Imidazole	7		
H10				10% w/v PEG 1000	10% w/v PEG 8000
H11	1,5 M Sodium chloride			10% v/v Ethanol	
H12		1,6 M Sodium citrate	6,5		

JBScreen Basic 1&2

Well#	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A1	25% v/v Ethylene Glycol				
A2	12% v/v Glycerol	1,5 M Ammonium Sulfate	100 mM Tris-HCl	8,5	
A3	1 M 1,6- Hexanediol		100 mM Sodium Acetate	4,6	10 mM Cobalt(II) Chloride
A4	2,5 M 1,6- Hexanediol		100 mM Sodium Citrate	5,6	
A5	3,4 M 1,6- Hexanediol		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Magnesium Chloride
A6	30% v/v MPD		100 mM Sodium Acetate	4,6	200 mM Sodium Chloride
A7	30% v/v MPD		100 mM Sodium Citrate	5,6	200 mM Ammonium Acetate
A8	30% v/v MPD		100 mM Sodium Acetate	4,6	20 mM Calcium Chloride
A9	30% v/v MPD	500 mM Ammonium Sulfate	100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
A10	30% v/v MPD		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	200 mM Sodium Citrate
A11	50% v/v MPD		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Ammonium dihydrogen Phosphate
A12	70% v/v MPD		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
B1	2% w/v Ethylene Imine Polymer		100 mM Sodium Citrate	5,6	500 mM Sodium Chloride
B2	2% v/v PEG 400	2 M Ammonium Sulfate	100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
B3	28% v/v PEG 400		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	200 mM Calcium Chloride
B4	30% v/v PEG 400		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Sodium Citrate
B5	30% v/v PEG 400		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	200 mM Magnesium Chloride
B6	30% v/v PEG 400		100 mM Sodium Acetate	4,6	100 mM Calcium Chloride
B7	20% v/v PEG 550 MME		100 mM Bicine	9,5	100 mM Sodium Chloride
B8	25% v/v PEG 550 MME		100 mM MES Sodium Salt	6,5	10 mM Zinc Sulfate
B9	10% w/v PEG 1000	10% w/v PEG 8000			
B10	30% w/v PEG 1500				
B11	20% w/v PEG 2000 MME		100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM Nickel(II) Chloride
B12	30% w/v PEG 2000 MME		100 mM Sodium Acetate	4,6	200 mM Ammonium Sulfate
C1	8% w/v PEG 4000		100 mM Sodium Acetate	4,6	
C2	20% w/v PEG 4000	20% v/v 2-Propanol	100 mM Sodium Citrate	5,6	
C3	20% w/v PEG 4000	10% v/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
C4	25% w/v PEG 4000		100 mM Sodium Acetate	4,6	200 mM Ammonium Sulfate
C5	30% w/v PEG 4000				200 mM Ammonium Sulfate
C6	30% w/v PEG 4000		100 mM Sodium Acetate	4,6	200 mM Ammonium Acetate
C7	30% w/v PEG 4000		100 mM Sodium Citrate	5,6	200 mM Ammonium Acetate
C8	30% w/v PEG 4000		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Sodium Acetate
C9	30% w/v PEG 4000		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Lithium Sulfate
C10	30% w/v PEG 4000		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Magnesium Chloride
C11	30% w/v PEG 5000 MME		100 mM MES Sodium Salt	6,5	200 mM Ammonium Sulfate
C12	10% w/v PEG 6000	2 M Sodium Chloride			
D1	10% w/v PEG 6000	5% v/v MPD	100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
D2	2% w/v PEG 8000	1 M Lithium Sulfate			
D3	8% w/v PEG 8000		100 mM Tris-HCl	8,5	
D4	10% w/v PEG 8000	8% v/v Ethylene Glycol	100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
D5	15% w/v PEG 8000	500 mM Lithium Sulfate			
D6	18% w/v PEG 8000		100 mM MES Sodium Salt	6,5	200 mM Calcium Acetate
D7	18% w/v PEG 8000		100 mM MES Sodium Salt	6,5	200 mM Zinc Acetate
D8	20% w/v PEG 8000				50 mM Potassium dihydrogen Phosphate
D9	20% w/v PEG 8000		100 mM MES Sodium Salt	6,5	200 mM Magnesium Acetate
D10	30% w/v PEG 8000		100 mM MES Sodium Salt	6,5	200 mM Sodium Acetate
D11	30% w/v PEG 8000				200 mM Ammonium Sulfate
D12	30% w/v PEG 8000		100 mM MES Sodium Salt	6,5	200 mM Ammonium Sulfate

JBScreen Basic 3&4

Well#	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
E1	10% w/v PEG 10000	2% v/v 1,4- Dioxane	100 mM Bicine	9,5	
E2	20% w/v PEG 10000		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
E3	12% w/v PEG 20000		100 mM MES Sodium Salt	6,5	
E4	5% v/v 2-Propanol	2 M Ammonium Sulfate			
E5	20% v/v 2-Propanol		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	200 mM Sodium Citrate
E6	20% v/v 2-Propanol		100 mM Sodium Acetate	4,6	200 mM Calcium Chloride
E7	30% v/v 2-Propanol		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	200 mM Magnesium Chloride
E8	30% v/v 2-Propanol		100 mM Tris-HCl	8,5	200 mM Ammonium Acetate
E9	10% v/v 1,4-Dioxane	1,6 M Ammonium Sulfate	100 mM MES Sodium Salt	6,5	
E10	35% v/v 1,4-Dioxane				
E11	10% v/v Ethanol	1,5 M Sodium Chloride			
E12	20% v/v Ethanol		100 mM Tris-HCl	8,5	
F1	25% v/v tert-Butanol		100 mM Tris-HCl	8,5	
F2	35% v/v tert-Butanol		100 mM Sodium Citrate	5,6	
F3	1 M Imidazole-HCl			7	
F4	1 M Lithium Sulfate		100 mM Tris-HCl	8,5	10 mM Nickel(II)-Chloride
F5	1,5 M Lithium Sulfate		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
F6	400 mM Sodium/Pottasium Tartrate				
F7	800 mM Sodium/Pottasium Tartrate		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
F8	1,4 M Sodium Citrate		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
F9	1,6 M Sodium Citrate			6,5	
F10	10% v/v Jeffamine M-600		100 mM Sodium Citrate	5,6	10 mM Ferric(III)-Chloride
F11	20% v/v Jeffamine M-600		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
F12	30% v/v Jeffamine M-600		100 mM MES Sodium Salt	6,5	50 mM Cesium Chloride
G1	800 mM Sodium dihydrogen Phosphate	800 mM Pottasium dihydrogen Phosphate	100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
G2	400 mM Ammonium dihydrogen Phosphate				
G3	1 M Ammonium dihydrogen Phosphate		100 mM Sodium Citrate	5,6	
G4	2 M Ammonium dihydrogen Phosphate		100 mM Tris-HCl	8,5	
G5	2 M Ammonium Formate		100 mM Sodium Acetate	4,6	
G6	4 M Ammonium Formate		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	
G7	2 M Ammonium Formate				
G8	500 mM Ammonium Sulfate	1 M Lithium Sulfate	100 mM Sodium Citrate	5,6	
G9	1,6 M Ammonium Sulfate		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	100 mM Sodium Chloride
G10	1,8 M Ammonium Sulfate		100 mM MES Sodium Salt	6,5	10 mM Cobalt(II) Chloride
G11	2 M Ammonium Sulfate		100 mM Tris-HCl	8,5	
G12	2 M Ammonium Sulfate				
H1	2 M Ammonium Sulfate		100 mM Sodium Acetate	4,6	
H2	2 M Ammonium Sulfate		100 mM Sodium Citrate	5,6	200 mM Sodium/Potassium Tartrate
H3	200 mM Magnesium Formate				
H4	1,6 M Magnesium Sulfate		100 mM MES Sodium Salt	6,5	
H5	2 M Magnesium Chloride		100 mM Bicine	9,5	
H6	1 M Sodium Acetate		100 mM Imidazole-HCl	6,5	
H7	1 M Sodium Acetate		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	50 mM Cadmium Sulfate
H8	1,4 M Sodium Acetate		100 mM MES Sodium Salt	6,5	
H9	500 mM Sodium Chloride	10 mM Magnesium Chloride			10 mM Hexadecyl trimethylammonium Bromide
H10	2 M Sodium Chloride		100 mM Sodium Acetate	4,6	
H11	2 M Sodium Chloride		100 mM MES Sodium Salt	6,5	100 mM Sodium/ Potassium dihydrogen Phosphate
H12	4,3 M Sodium Chloride		100 mM HEPES Sodium Salt	7,5	

Pre-Crystallization Test, Hampton Research	
Reagent A1	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate
Reagent A2	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.0 M Ammonium sulfate
Reagent B1	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
Reagent B2	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000